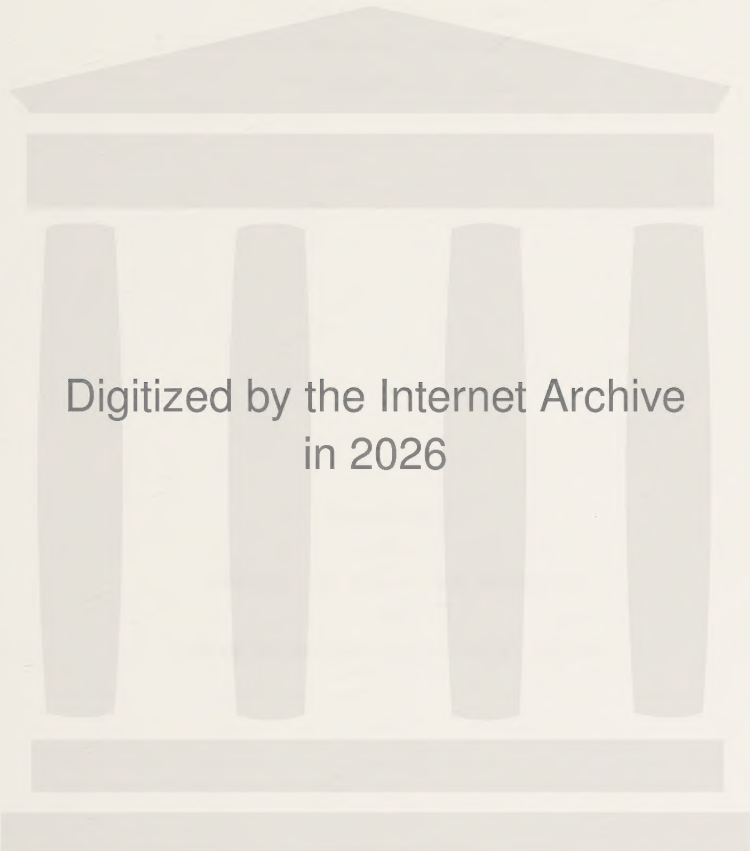


Charakterisierung eines
Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gens
aus *Escherichia coli*

Margit C. Kollenda

Diss
München
1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554826_0059

Charakterisierung eines
Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gens
aus Escherichia coli

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität, München

vorgelegt von
Margit C. Kollenda
München
September 1985

Dissertation, eingereicht am 24.09.1985

1. Gutachter: Prof. Dr. G. R. Hartmann

2. Gutachter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 8.11.1985

Für unsere Familie

Die Erde schenkt uns mehr Selbsterkenntnis als alle Bücher, weil sie
uns Widerstand leistet.

Aus der Einleitung zu
'Wind, Sand und Sterne'

Antoine de Saint-Exupéry

Die vorliegende Arbeit wurde von September 1981 bis September 1985 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G. R. Hartmann am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität, München ausgeführt.

Den Herren Prof. Dr. A. Böck, Prof. Dr. H. Schmieger, Prof. Dr. H. Wolf, Dr. D. Kamp und Frau Dr. J. Teifel danke ich für das Überlassen von Bakterienstämmen und Phagen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. R. Wirth, dessen Erfahrung bei DNA-Präparationen und Klonierungen für die hierzu durchgeführten Experimente sehr hilfreich war, und Herrn Dr. D. Kamp und dessen Arbeitskreis, der mir mit wertvollen Ratschlägen besonders bei der Durchführung der Kartierungsexperimente zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern für ihr Interesse, für kritische Diskussionen und für praktische Unterstützung danken.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	1
Einleitung	3
Material und Methoden	6
Material	6
Chemikalien und Geräte	6
Bakterien	7
Bakteriophagen	11
Plasmide	11
Nährmedien	12
Kulturbedingungen	13
Methoden	13
Transduktion mit dem Bakteriophagen Plkc	13
Mutagenisierung mit dem Bakteriophagen Mu cIts Amp	13
Gewinnung von Phagen-Lysaten von Mu cIts Amp	13
Mutagenese mit dem Bakteriophagen Mu cIts Amp	13
Kontrolle der Mutagenisierungseigenschaften von Mu cIts Amp	14
Kontrolle der Mu-Lysogenität der Mutanten	15
Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für Rifampicin	15
RNA-Polymerase-Aktivität in Rohextrakten	15
Genetische Kartierung Mu-lysogener Rifampicin- resistenter Mutanten	15
Konjugation mit Mu-immunem Stamm	15
Zygotische Induktion - Kartierung mit Auxo- trophiemutanten	16

Kotransduktion mit dem Bakteriophagen P1 Cmts100	17
Membranisolierung und Membrantrennung	17
Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS/PAA Gelelektrophorese)	18
Silverstain-Methode	18
Isolierung von Plasmiden	18
Methode a) Aufschluß mit Lysozym/Triton	18
Methode b) Alkalischer Aufschluß	18
Isolierung chromosomaler DNA aus <u>E. coli</u>	19
Methode a) Aufschluß mit Lysozym/Triton	19
Methode b) Aufschluß durch Hitze/SDS	19
Behandlung linearisierter Plasmide mit alkalischer Phosphatase	19
Agarose-Gelelektrophorese	20
Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	20
Ligasereaktionen	20
Transformation von <u>E. coli</u>	21
Aufschluß von Einzelkolonien	21
Analyse von rekombinanten DNA-Klonen	21
Extraktion von DNA aus Agarosegelen	21
Genexpression <u>in vitro</u>	22
Herstellung eines S 30-Extrakts	22
Radioaktive Markierung plasmidkodierter Proteine	22
Analyse des radioaktiven Einbaus in synthetisiertem Protein	22
<u>In vitro</u> -Transkription/Translation mit dem käuflichen 'Prokaryotic DNA-directed Translation kit'	22
Genexpression <u>in vivo</u>	23
Isolierung von Minizellen	23
Radioaktive Markierung plasmidkodierter Proteine	23

Ergebnisse

Transduktion des Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gens	24
Gewinnung von Rifampicin-resistenten Mutanten mit dem Bakteriophagen Mu cIts Amp	29
Charakterisierung der Mu-lysogenen Mutanten	33
Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für Rifampicin	33
Rifampicin-Empfindlichkeit der RNA-Polymerase	35
Genetische Kartierung der Mu-lysogenen Mutanten	38
Kopplung der phagenkodierten Ampicillin- mit der Rifampicin-Resistenz	38
Kartierung mit Auxotrophiemarkern	42
Kartierung durch Kotransduktion	52
Zellmembrananalyse der Mu-lysogenen Mutanten	54
Charakterisierung von <u>E. coli</u> mit kloniertem Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gen	55
Minimale Hemmkonzentration für Rifampicin	55
Resistenz gegenüber Rifamycin-Derivaten	57
Rifampicin-Empfindlichkeit der RNA-Polymerase	60
Transformierbarkeit der Rifampicin-Resistenz	60
Längenbestimmung der klonierten chromosomalen DNA-Fragmente	62
Genexpression <u>in vitro</u>	65
Einsatz von circulären Plasmiden	65
Einsatz von isolierten Restriktionsfragmenten	75
Inaktivierung des klonierten DNA-Fragments durch Insertion	77
Genexpression <u>in vivo</u>	85

Diskussion

Anhang I	Zusammenhang der Rifampicin-Resistenz mit Proteinen des Eisen-Rezeptor-Komplexes	102
Anhang II	Klonierung des Rifampicin-Resistenz ver- mittelnden Gens aus den Mutanten 5/3 und 10/1 t	105
Literaturverzeichnis		107
Abkürzungsverzeichnis		123
Lebenslauf		124

Zusammenfassung

Rifampicin-resistente E. coli-Bakterien, die sich durch Transduktion, durch Insertion des Bakteriophagen Mu und durch die Transformation des klonierten Resistenz vermittelnden Gens gewinnen lassen, zeigen unterschiedlich hohe minimale Hemmkonzentrationen für Rifampicin, die sich im Bereich von 85 µg/ml bis über 250 µg/ml in Vollmedium bewegen, und unterscheiden sich damit in ihrem Resistenzgrad stets deutlich vom Wildtyp, dessen minimale Hemmkonzentration bei 10 µg/ml Rifampicin liegt.

Die RNA-Polymerase der Mutanten, von vereinzelten Sekundärmutationen abgesehen, besitzt ein dem Wildtyp analoges Hemmverhalten für Rifampicin und ist somit von der Mutation zur Rifampicin-Resistenz nicht betroffen.

Die Ausprägung der Resistenz läßt sich durch eine Pl-Transduktion des Gens, d. h. durch den Transfer eines definierten Genabschnitts von $\leq 90\,000$ bp, in einen sensitiven Bakterienstamm erzielen und verhält sich somit vermutlich dominant.

Durch genetische Kartierung von Mu-lysogenen Rifampicin-resistenten Mutanten konnte der Genort der Mutation zur Rifampicin-Resistenz für alle untersuchten Mutanten übereinstimmend zwischen 28 und 37 min des E. coli-Chromosoms angegeben werden.

Das somit von rpoB-Mutanten (β Untereinheit der RNA-Polymerase bei Position 90 min des E. coli-Genoms) unabhängige Rifampicin-Resistenz vermittelnde Gen, dessen Mutation zu einer für die Klasse der Rifamycine spezifischen Resistenz führt, umfaßt in seiner strukturellen Einheit ≤ 1800 bp, wie die Längenbestimmung des durch Shotgun-Klonierung erhaltenen Gens sowie dessen Transformation des für die Ausprägung der Resistenz ausreichenden Genabschnitts zeigen.

Das als Insert im Vektor pBR 322 vorliegende Rifampicin-Resistenz vermittelnde Gen wurde als vollständiges circuläres Plasmid, als isoliertes Fragment und als durch Insertion eines Kan^r-Gens inaktivierten Rifampicin-Resistenz-Gens im in vitro-Genexpressionssystem eingesetzt. Übereinstimmend auch mit einer in vivo-Genexpression konnte dem klonierten Gen ein Protein der relativen Molmasse von $58\,000 \pm 5\,000$ zugeordnet werden. Die zusätzlich auftretenden Proteinbanden p8, p10, p39, p45 und p50 stellen vermutlich Fusionsprodukte der klonierten DNA mit

der Vektor DNA dar, da deren Eliminierung beim Einsatz des isolierten DNA-Fragments gelingt.

Wie das Experiment im System der Minizellen zeigte, wird die Expression des Gens durch die Gegenwart von Rifampicin nicht induziert und stellt damit ein vom selektiven Druck des Antibiotikums unabhängiges Gen dar; es kodiert wahrscheinlich für ein, allerdings mit geringer Kopienanzahl pro Zelle vertretenes und damit auch mit einem schwachen Promotor ausgerüstetes - d. h. für weniger empfindliche Methoden nicht faßbares - integrales Membranprotein.

Einleitung

Seit der Ära Paul Ehrlichs mit Beginn der angewandten Chemotherapie erwies sich das spontane Auftreten resistenter Organismen als problematisch. Die Möglichkeiten der Entwicklung und Ausprägung der Antibiotika-Resistenz sind vielfältig und können je nach Wirkungsmechanismus des Antibiotikums variieren (Franklin and Snow, 1975; Koch, 1981). In der überwiegenden Mehrzahl liegt der auftretenden Resistenz eine genetische Veränderung zugrunde, die z. B. eine enzymatische Detoxifizierung entwickelt, den Wirkort selbst mutagenisiert oder eine veränderte Permeation der Zellmembran verursacht (Koch, 1981). Nachdem der Wirkort bei einer Vielzahl von Antibiotika im Innern einer Bakterienzelle liegt und somit die klinische Anwendbarkeit im wesentlichen von dessen Permeationseigenschaften abhängt (Zähner, 1977; Höltje, 1979), läßt sich die Resistenz häufig auf Veränderungen der Zellmembran zurückführen (Franklin, 1974; Braun and Hantke, 1974). Hierbei erweisen sich gramnegative Bakterien, wie z. B. Escherichia coli und Salmonella typhimurium im allgemeinen häufiger betroffen, da sie aufgrund ihres spezifischen Membranaufbaus gegenüber Antibiotika resistenter sind als grampositive Bakterien.

Die Zellhülle gramnegativer Bakterien wird von einer Cytoplasmamembran (innere Membran) gebildet, deren Grundstruktur aus einer Doppelschicht ausgerichteter Phospholipidmoleküle besteht, deren hydrophile polare Reste nach außen weisen. Proteine können in diese Lipiddoppelschicht mehr oder weniger tief eingelagert sein (Höltje, 1979). Die innere Membran ist der Sitz für alle essentiellen energiegekoppelten Transportprozesse (Kadner and Bassford jr., 1978; Schnaitman, 1970 b). An die Cytoplasmamembran schließt sich ein wahrscheinlich einschichtiges Murein an. Diese Peptidoglycanschicht, die zur mechanischen Stabilität der Bakterienzelle beiträgt, ist etwa bei jeder zehnten Untereinheit an ein kleines Lipoprotein kovalent gebunden, das die äußere Membran mit dem Murein verzahnt, d. h., das Lipoprotein ist sowohl an die Peptidoglycanschicht als auch an die äußere Membran gebunden (Braun, 1977). Die äußere Membran, die die Zelloberfläche bildet, enthält vorwiegend Phospholipide, Proteine und nahezu das gesamte Lipopolysaccharid der Zellhülle (Osborn and Munson, 1974). Die Anordnung dieser Lipopolysaccharidmoleküle, die an der äußersten Schicht lokalisiert sind

und deren lange hydrophile Zuckerketten nach außen ragen, bestimmen entscheidend die antigenen und Permeationseigenschaften der Zelle (Braun, 1977). Für das gramnegative Bakterium stellt in erster Linie diese äußere Membran die Penetrationsbarriere dar (Burman et al., 1972; Nakae and Nikaido, 1975; DiRienzo et al., 1978). Während hydrophile Substanzen bis zu einer relativen Molmasse von ca. 650 ungehindert durch wassergefüllte Poren, die von den sog. Hauptproteinen (Porine) der äußeren Membran gebildet werden, eindringen (Wu and Lin, 1976; Lee et al., 1979), erweist sich der Zutritt hydrophober Substanzen im allgemeinen als weitaus schwieriger. Für die Aufnahme hydrophober Komponenten wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, wobei neben durch Membranproteine vermittelte erleichterte Diffusion oder der aktive Transport, den zu Nährstoffen strukturanaloge Antibiotika als Transportsystem mißbrauchen können, die Theorie des passiven Transports, d. h. Auflösen eines hydrophoben Antibiotikums in das Innere der Membran und dortige Verteilung am wahrscheinlichsten erscheint (Nikaido, 1976; Braun, 1977; Kadner, 1978).

Für das hydrophobe Antibiotikum Rifampicin (Mr 823), das bevorzugt gegen Tuberkulose eingesetzt wird, ist bisher unklar geblieben, welcher Transportwege es sich bedient. Als Wirkort im Innern der Zelle wurde übereinstimmend in der Literatur die β -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase beschrieben, wobei die Bindung des Antibiotikums an die RNA-Polymerase entscheidend in den Transkriptionsprozeß eingreift und die Synthese von RNA inhibiert (Kessler, 1979; Hartmann et al., im Druck). Durch Mutanten, die sich schon von jeher als geeignetes Studienobjekt für alle Arten von funktionellen Vorgängen erwiesen hatten, konnte gezeigt werden, daß auftretende Rifampicin-Resistenz in allen Fällen die β -Untereinheit der RNA-Polymerase betreffen (Tocchini-Valentini et al., 1968; Benveniste and Davies, 1973; Koch and Gross, 1979). Während die Existenz anderer Mutationsereignisse, z. B. eine veränderte Permeabilität der Zellmembran, als Ursache der Rifampicin-Resistenz von Khesin et al. (1969), Kersten and Kersten (1974), Yamamoto and Nomura (1979) für möglich gehalten wurde, wurde von Mindlin et al. (1972) diese Möglichkeit schlichtweg ausgeschlossen, nachdem Mutanten, die außerhalb des Genlocus der β -Untereinheit der RNA-Polymerase bei 90 min kartieren, nicht gefunden werden konnten. Eine mögliche Erklärung für das Scheitern der Suche

nach RNA-Polymerase-unabhängigen Mutanten könnte in der geringeren Häufigkeit von anderen zur Rifampicin-Resistenz führenden Mutationsergebnissen begründet sein, deren Auftreten somit unter der von RNA-Polymerase-Mutanten von 10^{-8} bis 10^{-9} pro Generation liegen sollte (Riva and Silvestri, 1972; Koch, 1981). Trotzdem konnte Tropschug (1980) durch Nitrosoguanidin gewonnene Escherichia coli-Mutanten isolieren, deren RNA-Polymerase im in vitro-Aktivitätstest eine dem Wildtyp vergleichbare Sensitivität aufwiesen, während die Mutanten in vivo in unterschiedlichem Ausmaß in Rifampicin-haltigem Medium zu wachsen vermochten, sei es aufgrund einer enzymatischen Inaktivierung des Rifampicins oder einer verringerten Permeabilität der Bakterienmembran für das Antibiotikum.

Untersuchungen bezüglich der Resistenzursache konzentrierten sich auf die Analyse der Membranzusammensetzung. In der Lipid- und selbst bei der Lipopolysaccharidzusammensetzung, die für die Permeation hydrophober Farbstoffe und Antibiotika entscheidend verantwortlich ist (Nikaido, 1976 and 1979; Lugtenberg et al., 1976; Scudamore et al., 1979), konnten keine Unterschiede zum sensitiven Wildtyp gefunden werden (Tropschug, 1981). Vergleichende Untersuchungen der Membranproteine konnten einige wenige Veränderungen aufdecken, ließen jedoch für den Resistenz-Mechanismus keine verbindliche Aussage zu (Kollenda, 1981).

Nachdem aufgrund der vorangegangenen Membranuntersuchungen die Resistenzursache nicht geklärt werden konnte, sollte einerseits durch genetische Kartierung der Genort der Rifampicin-Resistenz in E. coli bestimmt werden, um eine eindeutige Abgrenzung von RNA-Polymerase-Mutanten zu erlauben, und andererseits durch Klonieren des mutierten Gens und nachfolgende Genexpression in einem geeigneten in vitro- und in vivo-System das Genprodukt erfaßt werden. Sollte dies gelingen, so würde dies erstmals die Existenz von rpoB (β -Untereinheit der RNA-Polymerase) unabhängigen Mutanten in mehrfacher Hinsicht beweisen, und zudem könnten Erkenntnisse über die Expression des Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gens und dessen Auswirkung auf die Zelle gewonnen werden.

Material und Methoden

Material

Chemikalien und Geräte

Enzyme und nicht radioaktive Eichproteine, Boehringer, Mannheim
Restriktionsendonukleasen, New England Biolabs, Schwalbach
Nährmedien, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Aminosäuren und Zucker, Sigma Chemie, Taufkirchen
Rifamycine, Geschenk der Gruppo Lepetit, Mailand, Italien und Sigma
Chemie, Taufkirchen
Antibiotika, Sigma Chemie, Taufkirchen

Außer den bei Kollenda (1981) aufgeführten Chemikalien und Geräten
wurden ein Waring Blender, Braun AG, Frankfurt, eine Aminco-Pressure-Cell, American Instrument Company, Silver Spring, Maryland, USA und ein Vertikal-Gelelektrophoresesystem Modell V 16, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Maryland, USA verwendet.

Für die in vitro- und in vivo-Genexpression wurden [³⁵S] Methionin, [¹⁴C] methylierte Proteinmischungen, Amplify und der Prokaryotic-DNA-directed Translation Kit von Amersham und Buchler, Braunschweig bezogen.

Für die Autoradiographien wurden die Röntgenfilme Fuji RX bzw. Kodak X-OMAT AR von Photo Schaja, München benutzt.

Bakterien

Bakterienstamm	Genotyp	Literatur bzw. Herkunft
<u>E. coli</u> AB 1157 F ⁻	thr-1, leu-6, thi-1, lacY1, galK2, ara-14, xyl-15, mtl-1, proA2, his-4, argE3, str-31, tsx-33, sup-37	Bachmann (1972)
<u>E. coli</u> 5/3, 7/3 9/1, 10/1, 10/2, 110	wie AB 1157, rif ^r	Tropschug (1981)
<u>E. coli</u> DK 2646	enthält Mu cIts Amp	D. Kamp
<u>E. coli</u> C600 pLM54 F ⁻	thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, λ ⁻ , enthält Plasmid pLM54, tet ^r str ^r , Mu-immun.	Appleyard (1954) bzw. Kahmann and Kamp (1979)
<u>E. coli</u> HfrH 165	thy, thi, λ ⁻	Reiner (1969); Bachmann (1972)

Die Bakterienstämme E. coli DK 2646, E. coli C600 pLM54 und E. coli HfrH 165 waren ein Geschenk von Herrn Dr. D. Kamp, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.
Der Bakterienstamm E. coli AB 1157 war ein Geschenk von Herrn Prof. Dr. H. Schmieger, Institut für Genetik und Mikrobiologie, München.

Bakterienstamm	Genotyp	Literatur bzw. Herkunft
<u>E. coli</u> DS410 F ⁻	ara, azi ^r , tonA ^r , lacY, T6 ^s , minA, ColE ^s , λ ⁻ , minB, str ^r , xyl, mt1, thi	Dougan and Sherratt (1977)
<u>E. coli</u> 223 F ⁻ ,	pro, his, ilvA, argA, trp, galT, cysB, lacY, malA, xyl, str ^r , sup ^o	M. C. Jones-Mortimer
<u>E. coli</u> CGSC 6041 F ⁻ design. JF568	proC24, aroA357, his-53, purE41, ilv-277, met-65, lacY29, xyl-14, rpsL97, cycA1, cycB2?, tsx-63, λ ⁻ , str ^r	Foulds and Chai (1978)
<u>E. coli</u> CGSC 4539 F ⁻ design. AT3143	pyrF30, ilv-277, met-65 (leaky), his-53, purE41, proC24, pdxC3, xyl-14, lacY29, strA97, cycA1, cyc-2, tonA32?, tsx-63, λ ⁻	A. L. Taylor
<u>E. coli</u> ABI360 F ⁻	thi-1, argE3, his-4, proA2, aroD6, lacY1, galK2, mt1-1, xyl-5, tsx-29, supE44	Pittard and Wallace (1966)
<u>E. coli</u> CGSC 4517 F ⁻ design. AT2535	pyrB59, argH1, thi-1, his-1, purF1, mt1-2, xyl-7, malA1, ara-13, lacY1 or lacZ4, str-8-9 or -14, tsx-23 or tsx25, λ ^r , λ ⁻ , tonA2 or -14, supE44	A. L. Taylor

Bakterienstamm	Genotyp	Literatur bzw. Herkunft
<u>E. coli</u> CGSC 5364 F ⁻ design. JP5127	thi-1, trp-356, his-4, ilvC7, argE3, galEPL5, mal-358, lacY1, tsx-358, prd, str-704	Russell (1973)
<u>E. coli</u> AB1369 F ⁻	thi-1, argE3, cysB38, proA2, his-4, galK2, lacY1, mtl-1, xyl-5, tsx-29, λ^-	J. Teifel
<u>E. coli</u> HB101 F ⁻	hsdS20 (r_B^- , m_B^-), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (Sm^r), xyl-5, mtl-1, supE44, λ^-	Boyer and Roulland-Dussoix (1969)
<u>E. coli</u> RR1GS F ⁻	proA2, leu-6, thi-1, lacY1, str ^r , r_K^- m_K^- , enthält das Plasmid pBR 322	Sutcliffe (1979)
<u>E. coli</u> DH1 F ⁻	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r_K^- , m_K^+), supE44, recA1?, λ^-	Low (1968)

Die Bakterienstämme E. coli 223, E. coli CGSC 6041, E. coli CGSC 4539, E. coli AB1360, E. coli CGSC 4517 und E. coli CGSC 5364 waren ein Geschenk von Herrn Prof. Dr. A. Böck, Institut für Genetik und Mikrobiologie, München.

Der Bakterienstamm E. coli AB1369 war ein Geschenk von Frau Dr. J. Teifel, Institut für Genetik und Mikrobiologie, München.

Bakterienstamm	Genotyp	Literatur bzw. Herkunft
<u>E. coli</u> CSM50	enthält P1 Cmts100 lysogen	H. Schmieger
<u>E. coli</u> MRE600	RNase ⁻	Wade and Robinson (1966)
<u>E. coli</u> RR28 F ⁻	thi, leu, pro, lacY, gal, ara, mtl, xyl, supE44, endA, recA ⁻ , pfp ^r	Hennecke et al. (1982)

Der Bakterienstamm E. coli CSM50 war ein Geschenk von Herrn Prof. Dr. H. Schmieger, Institut für Genetik und Mikrobiologie, München.

Der Bakterienstamm E. coli RR28 war ein Geschenk von Herrn Dr. R. Wirth, Institut für Genetik und Mikrobiologie, München.

Der Bakterienstamm E. coli DS410 war ein Geschenk von Prof. Dr. H. Wolf, Max-v.-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, München.

Die Bakterienstämme E. coli HB101 und E. coli RRIGS waren ein Geschenk von Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker, Institut für Biochemie, München.

Der Bakterienstamm E. coli DH1 war ein Geschenk von Frau Prof. Dr. E. Fanning-Honegger, Institut für Biochemie, München.

Bakteriophagen

Bakteriophage Literatur

Mu cIts Amp Taylor (1963); Leach and Symonds (1979)

Plkc Yanofsky (1964)

P1 Cmts100 Rosner (1972)

Plasmide

Plasmid	Größe	Genetische Marker	<u>E. coli</u> Wirt	Literatur
---------	-------	-------------------	---------------------	-----------

pBR 322	2.6 Md	Ap ^r , Tc ^r	RRIGS	Bolivar et al. (1977)
---------	--------	-----------------------------------	-------	-----------------------

pHE3	2.95 Md	cam ^r , pfp ^S	HB101	Hennecke et al.(1982)
------	---------	-------------------------------------	-------	-----------------------

pUC-4K	2.4 Md	Kan ^r , Ap ^r	JM83	Vieira and Messing (1982)
--------	--------	------------------------------------	------	---------------------------

Der Phage Mu cIts Amp war ein Geschenk von Herrn Dr. D. Kamp, Max-Planck-Institut für Biochemie, München. Die Phagen Plkc und P1 Cmts100 waren ein Geschenk von Herrn Prof. Dr. H. Schmieger, Institut für Genetik und Mikrobiologie, München. Das Plasmid pHE3 war ein Geschenk von Herrn Dr. R. Wirth, Institut für Genetik und Mikrobiologie, München. Das Plasmid pUC-4K war ein Geschenk von Herrn W. Ritzthaler, Max-Planck-Institut für Biochemie, München.

Nährmedien

YT-Medium

8 g Bacto Trypton
5 g Yeast Extrakt
5 g NaCl
1 Liter deionisiertes Wasser

M9-Medium (Maniatis et al., 1982)

für die entsprechenden Bakterienstämme wurde das M9-Medium supplementiert mit:

Thiamin	[1 mg/l]
Adenosin (purE)	[50 mg/l]
Uracil (pyrF)	[50 mg/l]
Isoleucin	[50 mg/l]
Valin	[25 mg/l]
Shikimisäure (aro)	[10 mg/l]
Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan (aro)	[je 40 mg/l]
zusätzlich notwendige Aminosäuren	[je 50 mg/l]
Zucker (glc, lac, gal, ara, mtl, xyl)	[je 2g/l]

DH1-Medium

20 g Bacto Trypton
5 g Yeast Extrakt
5 g MgSO_4 (bei Tetracyclinegegenwart 5 g NaCl)
ca. 3.8 ml 2n KOH pH 7.6
1 Liter deionisiertes Wasser

Top Agar

0.8 g Bacto Trypton
0.4 g Yeast Extrakt
0.5 g NaCl
0.5 g Bacto Agar
100 ml deionisiertes Wasser

Kulturbedingungen

Die Kulturbedingungen in Flüssigmedien, auf Agarplatten und in Glycerinkultur sind bei Kollenda (1981) beschrieben.

Methoden

Transduktion mit dem Bakteriophagen Plkc

Die Transduktion mit dem temperenten Bakteriophagen Plkc wurde, wie bei Kollenda (1981) beschrieben, durchgeführt.

Mutagenisierung mit dem Phagen Mu cIts Amp

Gewinnung von Phagen-Lysaten von Mu cIts Amp

10 ml YT-Medium wurden mit 0.1 ml einer Übernachtskultur von E. coli DK 2646 angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (550 nm) von 0.7-0.8 bei 30°C inkubiert. Die anschließende Hitzeinduktion erfolgte 10 min bei 42°C. Die bei weiterer Inkubation bei nunmehr 37°C sich einstellende Lyse wurde unter Kontrolle der optischen Dichte verfolgt. Bei einem Minimum der optischen Dichte wurden einige Tropfen Chloroform hinzugefügt, 3 min geschüttelt, auf 0°C abgekühlt, 30 min bei 12 000 UpM im SS-34-Rotor abzentrifugiert und das klare Phagenlysate mit 0.1 ml Chloroform versetzt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C für maximal 2 Wochen; der Titer wurde nach Miller (1972) bestimmt.

Mutagenese mit dem Bakteriophagen Mu cIts Amp

Zur Mutagenese wurden zwei Verfahren angewandt:

auf Festagar (Boram and Abelson, 1971)

Von Einzelkolonien des Stammes E. coli HfrH 165 wurden unabhängige Übernachtskulturen angezüchtet und je 0.1 ml dieser Kulturen mit 2.5 ml Top-Agar auf YT-Platten ausgestrichen. Nach Erstarren des Agars wurde jeweils ein Tropfen des Mu-Lysats (10^6 PFU/ml) verschiedener Verdünnungen aufgetropft. Die Platten wurden 10-12 Stunden bei 30°C inkubiert. Aus dem sich gebildeten Plaque wurde eine Impföse entnom-

men und in YT-Medium bei 30°C angezüchtet. Von dieser Übernachtskultur wurde je 0.1 ml auf YT-Platten mit 120 µg/ml Rifampicin und 20 µg/ml Ampicillin zur Selektion Mu-lysogener Rifampicin-resistenter Mutanten ausgestrichen. Zur Ermittlung der Mu-lysogenen Überlebenden wurden 0.1 ml unterschiedlicher Verdünnungen der Übernachtskultur auf Ampicillin-haltigen (20 µg/ml) YT Agar ausgestrichen.

Rifampicin-resistente Einzelkolonien, die nach 12 h gewachsen waren, wurden durch mehrmaliges Ausstreichen auf oben genanntem Selektionsmedium gereinigt.

in Flüssigkultur (D. Kamp, persönliche Mitteilung)

Je 5 ml von unabhängig voneinander angezüchteten Übernachtskulturen des Stammes E. coli HfrH 165 wurden abzentrifugiert, der Niederschlag in 3 ml TM-Puffer (0.01 M Tris HCl pH 7.5, 0.01 M MgCl₂) suspendiert, mit 3 ml YT-Medium versetzt und 0.2 ml unverdünntes Mu-Phagen-Lysat hinzugefügt. Bei 30°C unter sanftem Schütteln (70 UpM) wurde 12 h inkubiert. Anschließend wurden jeweils 0.1 ml direkt auf YT-Platten mit 120 µg/ml Rifampicin und 20 µg/ml Ampicillin ausgestrichen. Nach einer Inkubation von 12 h wurden gewachsene Einzelkolonien auf obigem Selektionsmedium durch mehrmaliges Ausstreichen gereinigt.

Kontrolle der Mutagenisierungshäufigkeit von Mu cIts Amp

Zur Erfassung der Mutagenisierungshäufigkeit des Phagen Mu wurde der Stamm HfrH 165 auf Festagar bzw. in Flüssigkultur, wie oben beschrieben, mit Mu infiziert. Durch Ausstreichen der Mu-lysogenen Übernachtskultur auf YT-Platten unter Zusatz von 20 µg/ml Ampicillin wurden nach 12-stündiger Inkubation bei 30°C Einzelkolonien selektioniert, die anschließend auf unsupplementiertes M9-Medium, das nur Glucose und Thiamin enthielt, abgeimpft wurden. Mit dieser Technik lassen sich sämtliche entstandenen Auxotrophien der Mu-lysogenen Mutanten durch den quantitativen Vergleich des Wachstums auf YT/Ampicillin und unsupplementiertem M9/Ampicillin bestimmen.

Kontrolle der Mu-Lysogenität der Mutanten

Zur Sicherstellung der Mu-Insertion im Bakteriengenom wurden YT-Platten mit 100 µg/ml Rifampicin und 20 µg/ml Ampicillin mit je 0.1 ml von Übernachtskulturen der jeweiligen Mutante bestrichen und 12 h bei 40°C bebrütet. Als Kontrolle diente der Wildtypstamm E. coli HfrH 165.

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen für Rifampicin

Die minimalen Hemmkonzentrationen (Zähler, 1965) von Rifampicin-resistenten Mutanten wurden, wie bei Kollenda (1981) beschrieben, ermittelt. Die niedrigste Antibiotikakonzentration, bei der kein Bakterienwachstum, sei es nun auf YT- oder M9-Medium, mehr auftrat, entsprach der minimalen Hemmkonzentration (vgl. Seite 25).

RNA-Polymerase-Aktivität in Rohextrakten

Zur Unterscheidung von RNA-Polymerase- und rpoB-unabhängigen Mutanten wurde ein Test der RNA-Polymerase-Aktivität von Rohextrakten der jeweiligen Mutante in Gegenwart von Rifampicin durchgeführt. Das Testsystem ist, bis auf die nachfolgenden Änderungen, bei Kollenda (1981) beschrieben.

Der Aufschluß der Zellen erfolgte unter Beschallung mit dem B12 Sonifier Ultraschall (4x20sec, Stellung 3), und der Rohextrakt wurde ohne vorheriges Einfrieren im Test eingesetzt. Als radioaktives Triphosphat wurde [α ³²P]UTP (5 mM) mit 50 000 IpM/nMol verwendet.

Genetische Kartierung Mu-lysogener Rifampicin-resistenter Mutanten

Konjugation mit Mu-immunem Stamm

Übernachtskulturen in YT-Medium von E. coli C600 pLM54 (F⁻, Tc^r, Sm^r, thi, thr) und der jeweils zu testenden Mu-lysogenen Mutante (Hfr, Ap^r,

Rif^r, thi) wurden verdünnt und bis zum Erreichen einer Titer von 10^7 Bakterien pro ml (Mu-lysogene Mutante) bzw. 10^8 Bakterien pro ml des Rezipientenstammes C600 pLM54 inkubiert. Von jeder der Kulturen wurden je 2 ml (Verhältnis der Bakterienkonzentration 1:10 für Mutante und Rezipient) gemeinsam in einem 100 ml Anzuchtkolben 1.5 h bei 30°C bei 30 UpM geschüttelt. Weitere 30 min wurde bei 100 UpM inkubiert und anschließend wurden 10^{-1} - und 10^{-2} -Verdünnungen der Kultur auf M9-Agarplatten, die Thiamin und 20 µg/ml Tetracyclin enthielten, ausgestrichen.

Auf die Selektion des Markers thi wurde verzichtet, da sich Vitaminmarker in den meisten Fällen als instabil erweisen (Hayes, 1968).

Nach einer 48-stündigen Inkubation bei 30°C wurden die so selektionierten Einzelkolonien jeweils auf folgende Platten in einem Gittermuster überimpft:

YT/20 µg/ml Tetracyclin/20 µg/ml Ampicillin

YT/20 µg/ml Tetracyclin/200 µg/ml Streptomycin

YT/20 µg/ml Tetracyclin/100 µg/ml Rifampicin

Die Platten wurden 24 h bei 30°C inkubiert, verglichen und das Wachstum der Einzelkolonien auf den spezifischen Antibiotikamedien quantitativ bestimmt.

Zygotische Induktion - Kartierung mit Auxotrophievarianten

Kulturen von E. coli HfrH 165 im logarithmischen Wachstum mit einem Titer von 10^7 Bakterien pro ml wurden mit Kulturen unterschiedlicher auxotropher Mu-sensitiver E. coli-Stämme des Titer 10^8 Bakterien pro ml konjugiert. Je 2 ml der Kulturen wurden bei 30°C, bei 30 UpM 2 Stunden in einem 100 ml Anzuchtkolben inkubiert. Anschließend wurde jeweils 0.1 ml einer 10^{-2} -Verdünnung des Konjugationsansatzes auf M9-Platten, die außer dem Zusatz des auf der Genkarte frühesten zu selektionierenden genetischen Marker des jeweiligen Rezipientenstammes alle zum Wachstum notwendigen Aminosäuren enthielt, ausgestrichen.

Nach einer 48-stündigen Inkubation wurden die Einzelkolonien auf die entsprechenden M9-Platten mit jeweils einem fehlenden Marker-Zusatz überimpft und nach 24 h quantitativ erfaßt.

Kotransduktion mit dem Bakteriophagen P1 Cmts100

Das Lysat des Phagen P1 Cmts100 wurde analog zur Hitzeinduktion von Mu (Seite 13) aus dem Stamm E. coli CSM50/P1 Cmts100 erhalten.

Infektion der Mutanten mit dem Phagen-Lysat

Je 0.1 ml von Übernachtskulturen in YT-Medium der Mu-lysogenen Mutanten wurde mit 5 µl P1 Cmts100-Lysat versetzt und 40 min bei 30°C inkubiert. Pro Ansatz wurde jeweils 0.1 ml auf YT-Platten mit 20 µg/ml Chloramphenicol ausgestrichen und 24 h bei 30°C inkubiert. Erhaltene Einzelkolonien wurden getrennt bei 30°C in 10 ml YT-Medium bis zum Erreichen eines Titers von 2×10^8 Bakterien pro ml angezüchtet und mit der zweifachen Menge an 50°C vorgewärmtem YT-Medium versetzt und bei 37°C für weitere 1.5 h bei 130 UpM geschüttelt. Nach Beendigung der Lyse wurde auf 0°C abgekühlt und bei 4°C 30 min bei 12 000 UpM im SS-34-Rotor abzentrifugiert. Dem klaren Lysat wurden 0.3 ml Chloroform zugesetzt. Die Aufbewahrung der einzelnen Lysate erfolgte bei 4°C (vgl. Seite 53).

5 ml von Übernachtskulturen auxotropher E. coli-Stämme wurden abzentrifugiert, in 5 ml sterilem MC-Puffer (0.1 M MgSO_4 , 0.05 M CaCl_2) suspendiert und bei 30°C 15 min geschüttelt. Zu je 0.1 ml dieser Bakteriensuspension wurde 0.1 ml der P1 Cmts100-Mutanten-Lysate in verschiedenen Verdünnungen (10^{-1} bis 10^{-3}) hinzugegeben und 20 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde eine Readsorption der Phagen durch Zusatz von je 0.2 ml 1 M Natriumcitrat, das Ca^{2+} Ionen abfängt, verhindert. Die einzelnen Ansätze wurden nach einer weiteren Inkubation von 2, 4 bzw. 24 h mit je 2.5 ml Top-Agar versetzt und auf M9-Platten, denen der zu selektionierende Marker-Zusatz fehlte, aber 20 µg/ml Ampicillin, 20 µg/ml Chloramphenicol und 100 µg/ml Rifampicin enthielten, ausgestrichen. Nach Erstarren des Agars wurden die Platten bei 30°C 24 Stunden inkubiert.

Membranisolierung und Membrantrennung

Die Durchführung der Membranisolierungen und Membrantrennungen der Bakterienzellen aus logarithmischem sowie stationärem Wachstum erfolgte entsprechend der Methode von Osborn et al. (1972) bzw. Witholt

et al. (1976) und van Heerikhuizen et al. (1975), wie bei Kollenda (1981) beschrieben.

Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS/PAA Gelelektrophorese)

Die Gelelektrophorese zur Analyse von Membranproteinen und zur Analyse der synthetisierten Proteine des in vivo-Genexpressionssystems wurde mit Flachgelen der Konzentration von 11% Acrylamid mit einer Trennlänge von 10 cm nach der Methode von Laemmli (1970) und Lugtenberg et al. (1975), wie bei Kollenda (1981) beschrieben, durchgeführt. Bei Gelen mit einer Trennlänge von 30 cm wurden die eingesetzten Mengen verdreifacht und zusätzlich ein 20% Stützgel (Maniatis et al., 1982) mit einer Höhe von 2.5 cm gegossen.

Die Auftrennung der markierten Proteine des in vitro-Genexpressionssystems erfolgte auf 15% SDS/PAA Gelen (Maniatis et al. 1982). Das Sammelgel besaß in allen Fällen die Acrylamidkonzentration von 3% und hatte die bei Kollenda (1981) beschriebene Zusammensetzung. Elektrophoresepuffer und SDS/PAA-Probenpuffer sind bei Kollenda (1981) beschrieben. Die Gele wurden entweder angefärbt (Fast Green FCF oder Silverstain), oder bei radioaktiv markierten Proben wurden die PAA-Gele 30 min fixiert (500 ml Isopropanol, 200 ml Eisessig, 1.3 l H₂O), 30 min in Amplify getränkt, getrocknet und bei -80°C autoradiographiert.

Silverstain-Methode

Zur Sichtbarmachung geringer Proteinmengen wurde ein "Silverstain" nach Sammons et al. (1981) angewendet.

Isolierung von Plasmiden

Methode a) Aufschluß mit Lysozym/Triton

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Humphreys et al. (1975) nach der Vorschrift von Brack (1983).

Methode b) Alkalischer Aufschluß

Die Plasmidisolierung mittels des alkalischen Aufschlusses wurde wie bei Maniatis et al. (1982) durchgeführt.

Isolierung chromosomaler DNA aus E. coli

Methode a) Aufschluß mit Lysozym/Triton

Die Zellen wurden in YT-Medium ohne Antibiotikazusätze bis zu einer optischen Dichte von 0.8 bei 550 nm gezüchtet. Anschließend wurde entsprechend der Plasmidisolierung Methode a die Lyse und nachfolgende Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Nach mehrmaligem Ausschütteln mit wassergesättigtem Butanol zur Entfernung des Ethidiumbromids und nachfolgender Dialyse wurde die chromosomale DNA durch zweimaliges Phenolisieren und zweimaliges Ausschütteln mit Isoamylalkohol/Chloroform (1:24) gereingt. Zur Konzentrierung der DNA folgte eine Ethanol-fällung.

Methode b) Aufschluß durch Hitze/SDS

Zum Teil bessere Ausbeuten erhält man mit der Methode nach Wirth (persönliche Mitteilung).

Nach Abzentrifugation der Bakterienkultur (1 l) der optischen Dichte von 0.8 bei 550 nm wurde der Niederschlag in 25 ml (100 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) suspendiert. Nach Zugabe von 1/19 Volumen (1.3 ml) 10% SDS wurde die Suspension im Wasserbad bei 65°C für 10 min bis zum deutlichen Einsatz der Lyse unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 1/7 Volumen (4 ml) 4 M KCl und sofortiges Abkühlen auf 0°C das SDS ausgefällt. Nach ca. 30 min im Eis/Wasserbad wurde im SS-34-Rotor 30 min bei 15 000 UpM 0°C abzentrifugiert. Mit dem klaren Überstand wurde wie bei der Methode a verfahren.

Behandlung linearisierter Plasmide mit alkalischer Phosphatase

Plasmidlösungen (5 µg DNA in 10 µl TE-Puffer (Maniatis et al., 1982)) wurden mit 2 µl 10x sog. CIP-Puffer (800 mM Tris HCl pH 8.0, 100 mM MgCl₂, 2 mM ZnCl₂), 1 µl alkalischer Phosphatase und 7 µl H₂O versetzt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz phenolisiert, das Plasmid mit Ethanol gefällt und erneut in TE-Puffer aufgenommen.

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Identifizierung von DNA und zur Auftrennung von Restriktionsfragmenten wurden horizontale Agarosegele in unterschiedlichen Größen der Konzentration 0.8% und einer Dicke von 2-5 mm verwendet. Pro 10 ml Agaroselösung wurden 0.08 g Agarose, 1 ml 10xTBE-Puffer (Maniatis et al., 1982) und 9 ml H₂O im Mikrowellenherd erhitzt, auf ca. 60°C abgekühlt und mit 1 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt. Der Elektrophoresepuffer (1xTBE-Puffer) enthielt 0.5 µg/ml EtBr. Übliche Elektrophoresebedingungen waren 3 V pro cm Gellänge. Der Probenpuffer für Agarosegele ist bei Maniatis et al. (1982) beschrieben. Die DNA wurde durch Bestrahlen mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera (Film Typ 107) bei Blende 16 und einer Belichtungszeit von ca. 20 sec photographiert.

Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Einzelansätze von DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen wurden in einem Gesamtvolumen von ca. 20 bis 100 µl durchgeführt. Allgemein wurden pro µg DNA eine Einheit (Unit) des Restriktionsenzym hinzugefügt. Als Restriktionspuffer, der in 10facher Konzentration in 1/10 Volumen hinzugefügt wurde, dienten die bei Maniatis et al. (1982) beschriebenen H- bzw. M- bzw. L-Salt Puffer; die Inkubationstemperatur betrug entsprechend den Herstellerhinweisen, soweit nicht anders angegeben, 37°C. Die Dauer der Inkubation richtete sich nach der gewünschten Abbaustufe (0.5 bis 24 h). Die Ansätze wurden anschließend phenolisiert, die DNA mit Ethanol gefällt und in 1x TE-Puffer aufgenommen.

Ligasereaktionen

Ligasereaktionen wurden meist in einem Volumen von 25 µl mit einer Gesamt-DNA-Konzentration von 6 µg ausgeführt. Zu 10 µl DNA-Lösung wurden 10 µl 10x Ligasepuffer (Maniatis et al., 1982), 4 µl H₂O und 1 µl (≡ 1 Unit) T4 DNA Ligase hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei 37°C und anschließend für weitere 12 h bei 4°C inkubiert.

Transformation von E. coli

Die Transformation der E. coli-Stämme HB101, DS410 und RR28 wurde, wie bei Maniatis et al. (1982) beschrieben, durchgeführt. Transformationsansätze enthielten 10-100 ng DNA in 5-10 µl Volumen.

Kompetente Zellen des Stammes DH1 wurden, wie bei Hanahan (1983) und Maniatis et al. (1982) beschrieben, gewonnen. Die Transformation erfolgte wie bei den übrigen Bakterienstämmen.

Aufschluß von Einzelkolonien

Es wurde nach der Methode von Barnes (1977) und Maniatis et al. (1982) vorgegangen.

Analyse von rekombinanten DNA-Klonen

5 ml einer Übernachtskultur eines zu überprüfenden Klones wurden nach dem bei Maniatis et al. (1982) beschriebenen alkalischen Aufschluß in seinem Plasmidgehalt untersucht.

Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die zu isolierende DNA wurde auf einem präparativen low temperature-melting Agarosegel (0.8%) im Kühlraum bei 60 V aufgetrennt. Unter langwelligem UV-Licht wurde die gewünschte DNA herausgeschnitten, bei 65°C geschmolzen und viermal mit dem halben Volumen Tris-gesättigtem Phenol und zuletzt mit einem Überschuß Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1x TE-Puffer aufgenommen.

Genexpression in vitro

Herstellung eines S-30-Extrakts

Der zellfreie S-30-Extrakt des E. coli-Stammes MRE600 wurde entsprechend der Methode von Zubay (1973), Chen and Zubay (1983) und Pratt (1980) hergestellt. Sämtliche Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat behandeltem Wasser bereitet (Pratt et al., 1981).

Radioaktive Markierung plasmidkodierter Proteine durch in vitro-Genexpression

Zweifach über CsCl-Gradienten gereinigte Plasmide bzw. isolierte DNA-Fragmente wurden, wie bei Collins (1979) und McCarthy et al. (1985) beschrieben, unter Verwendung des S-30-Extrakts im in vitro-Transkriptions/Translations-System eingesetzt. Nach einer 25 bzw. 55 minütigen Inkubation in Gegenwart von 10-15 μCi (1000 Ci/nmol) [^{35}S] Methionin pro Ansatz wurden jeweils 5 μl der Reaktionsmischung mit 5 μl 2x SDS/PAA-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. Die Analyse erfolgte auf 15% SDS/PAA-Gelen.

Analyse des radioaktiven Einbaus in synthetisiertem Protein

5-10 μl der Reaktionsmischung wurden, wie bei McCarthy et al. (1985) beschrieben, mit eiskalter 10% Trichloressigsäure auf Whatman GF/A glassfibre-Filter präzipitiert, mehrmals mit 5% Trichloressigsäure gewaschen und die Radioaktivität ermittelt.

In vitro-Transkription/Translation mit dem käuflichen "Prokaryotic DNA directed Translation kit"

Die Durchführung der Reaktion erfolgte entsprechend den Hinweisen des Herstellers. In Abweichung dieser Vorschrift wurden die Proben nach Beendigung der Inkubation jedoch nicht gekocht, sondern in Gegenwart von 2x SDS/PAA-Probenpuffer 10 min bei 37°C inkubiert.

Genexpression in vivo

Isolierung von Minizellen

Die Isolierung von plasmidhaltigen Minizellen des E. coli-Stammes DS410 wurde nach der Vorschrift von Roozen et al. (1971) und Reeve (1979) durchgeführt.

Zum Abbau zelleigener mRNA wurden die Minizellen, bevor sie auf den zweiten Sucrose-Gradienten geschichtet wurden, 30 min in M9-Medium, das 20 µg/ml Cycloserin enthielt, inkubiert (Reeve, 1978).

Die Minizellen wurden in 0.2 ml Aliquots mit einer optischen Dichte von 0.2 bei 600 nm bei -80°C aufbewahrt.

Radioaktive Markierung plasmidkodierter Proteine durch in vivo-Genexpression

Die radioaktive Markierung plasmidkodierter Proteine erfolgte in Anlehnung an Rodriguez and Tait (1983).

Die langsam aufgetaute Minizellenfraktion wurde 10 min abzentrifugiert, in 75 µl M9-Medium, das 20 µg/ml Cycloserin enthielt (Reeve, 1978), suspendiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 25 µl Methionin-Assay-Medium (Steele et al., 1949), das 150 µCi/ml, d. h. pro Ansatz ca. 6 µCi, enthielt, zugefügt und unterschiedlich lange inkubiert (30 min, 3 h, 15 h). Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert, in 50 µl 1x SDS/PAA-Probenpuffer aufgenommen und 3 min gekocht. Die Analyse erfolgte auf 11% SDS/PAA-Gelen.

Ergebnisse

Transduktion des Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gens

Durch Transduktion einer genetisch determinierten Eigenschaft mittels eines transduzierenden Bakteriophagen wie P1 läßt sich zeigen, daß die untersuchte Eigenschaft auf einem Genabschnitt von maximal 6×10^7 D (ca. 90 000 bp), was etwa 2 min der E. coli-Genkarte entspricht, liegen muß, da die Aufnahmekapazität des transduzierenden Phagen für Bakterien DNA auf diese Größe beschränkt ist (Caro and Berg, 1971; Goodenough and Levine, 1975; Stent and Calendar, 1978). Die Transduzierbarkeit der Rifampicin-Resistenz zweier unabhängiger Mutanten des E. coli-Stammes AB 1157 konnte bereits früher gezeigt werden (Kollenda, 1981). Es erschien mir aber wichtig, bei allen mir zur Verfügung stehenden, von Tropschug (1981) isolierten Rifampicin-resistenten Mutanten des obigen Ausgangsstammes die Transduzierbarkeit der Rifampicin-Resistenz zu bestätigen. Diese Versuche wurden, wie bei Kollenda (1981) beschrieben, durchgeführt. Als Rezipientenstamm der aus den einzelnen Mutanten gewonnenen Plc-Lysate diente E. coli AB 1157. Die Lysate der Donorstämme wurden mit dem Phagen Plc hergestellt. Der Titer der Pl-Lysate der Donorstämme betrug durchschnittlich 2.4×10^7 PFU/ml. Der Nachweis der gelungenen Transduktion erfolgte durch Wachstum der Transduktanten auf supplementierten M9-Platten in Gegenwart von 50 [$\mu\text{g/ml}$] Rifampicin (Tabelle 1). Die durchschnittliche Häufigkeit des Auftretens von Transduktanten lag bei 1.6×10^{-5} im Vergleich zu einer Spontanmutationsrate von 5×10^{-9} bei einer Ausgangszellzahl von 2×10^9 Zellen pro ml des Rezipientenstammes AB 1157.

Tabelle 1 Häufigkeit des Transduktionseignisses für die Rifampicin-Resistenz mit Plkc im Rezipientenstamm E. coli AB 1157

Bezeichnung des Donorstammes	Häufigkeit der Transduktion (Auftreten rif-resistenter Kolonien, bezogen auf ausgestrichene Rezipientenzellzahl)	Bezeichnung der resultierenden Transduktante
5/3	0.5×10^{-5}	5/3 t
5/3 t	2.5×10^{-5}	5/3 t 2
7/3	3.5×10^{-5}	7/3 t
9/1	5.0×10^{-8}	9/1 t
10/1	1.3×10^{-5}	10/1 t
10/1 t	4.5×10^{-5}	10/1 t 2
10/2	0.5×10^{-5}	10/2 t
110	0.2×10^{-5}	110 t

Die isolierten Transduktanten wurden zunächst durch die Bestimmung der zur Wachstumshemmung notwendigen kleinsten Rifampicin-Konzentration charakterisiert und mit den Donorstämmen verglichen (Tabelle 2).

Die Konzentration an Rifampicin, bei der auf Agarplatten mit M9- bzw. YT-Medium nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C kein Wachstum mehr erfolgte, wird als minimale Hemmkonzentration angegeben.

Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Rifampicin-Resistenz vom eingesetzten Medium, da sämtliche Mutanten und Transduktanten in YT-Medium gegenüber M9-Medium höhere Resistenzfaktoren aufwiesen. Weiterhin war bemerkenswert, daß auch nahezu alle Transduktanten bis auf 7/3 | 7/3t, gemessen an der minimalen Hemmkonzentration für den Donorstamm, eine Steigerung des Resistenzfaktors zeigen, dessen beträchtliche Erhöhung besonders beim Vergleich der Stämme 10/2 mit 10/2 t und 110 mit 110t auffällt (Tabelle 2). Dieser Effekt der erhöhten Rifampicin-Toleranz ist möglicherweise in der Abtrennung zusätzlicher Mutationen der Donorstämme durch die Transduktion begründet.

Bei einer wiederholten Transduktion (5/3 t | 5/3 t 2, bzw. 10/1 t | 10/1 t 2) sollte eine weitere Steigerung der minimalen Hemmkonzentration folglich nicht mehr auftreten. Der Stamm 10/1 t 2 verhält sich erwartungsgemäß, während die minimale Hemmkonzentration von 5/3 t 2 im Vergleich zu 5/3 t nochmals erhöht ist (Tabelle 2). Die Ursache für dieses unerwartete Verhalten wird durch die ergänzende Charakterisierung im nachfolgenden Abschnitt und in Tabelle 3 erläutert.

Tabelle 2 Minimale Hemmkonzentrationen für Rifampicin in M9- bzw. YT-Medium für die Mutanten und deren Transduktanten des Ausgangsstammes E. coli AB 1157

Bakterienstamm	Minimale Hemmkonzentration [µg/ml] Rifampicin		Resistenzfaktor	
	M9	YT	M9	YT
AB 1157	15	15	1	1
5/3	55	70	3.6	4.6
5/3 t	85	>200	5.6	>13
5/3 t 2	>200	>200	>13	>13
7/3	25	85	1.6	5.6
7/3 t	25	85	1.6	5.6
9/1	20	65	1.3	4.3
9/1 t	45	165	3	11
10/1	125	150	8.3	10
10/1 t	160	>200	10.6	>13
10/1 t 2	160	>200	10.6	>13
10/2	20	95	1.3	6.3
10/2 t	105	>200	7	>13
110	30	105	2	7
110 t	115	>200	7.6	>13

Beim Vorliegen von *rpoB*-unabhängigen Rifampicin-resistenten Mutanten sollten alle Transduktanten eine dem E. coli AB 1157 bzw. den Donorstämmen entsprechende Empfindlichkeit der RNA-Polymerase gegenüber Rifampicin zeigen. Die Messung der RNA-Polymerase-Aktivität in Rohextrakten aller Donorstämme und deren Transduktanten in Abwesenheit und in Gegenwart unterschiedlicher Rifampicin-Konzentrationen von 0.08, 0.4, 0.8 und 4 [$\mu\text{g/ml}$] sollte über die Art der Mutation, d. h. mutierte RNA-Polymerase oder Mutation in einer anderen Zellkomponente, Aufschluß geben (Tabelle 3). Die Durchführung des Versuchs erfolgte, wie bei Kollenda (1981) beschrieben, mit den auf Seite 15 angegebenen Änderungen.

Anhand der Meßergebnisse kann man den Schluß ziehen, daß es sich bei den isolierten Transduktanten, außer bei 5/3 t 2, um RNA-Polymerase-unabhängige Mutanten handelt, deren Mutation die RNA-Polymerase unbeeinflußt ließ, da diese, wie aus Tabelle 3 ersichtlich, ein dem Wildtyp vergleichbares Hemmverhalten in Gegenwart von Rifampicin zeigt.

Die gelelektrophoretische Analyse von Bakterienmembranen zweier Mutanten und deren Transduktanten (5/3 | 5/3 t, 10/1 | 10/1 t) (Kollenda, 1981) zeigt unter anderem ein zum E. coli AB 1157 verändertes Proteinmuster von Proteinen, deren Funktion es ist, für den Eisenbedarf der Zelle zu sorgen (Hancock and Braun, 1976; Hantke, 1978). Die Vermutung, daß Enzyme des Eisenstoffwechsels in Bakterien auf eine noch nicht geklärte Weise beim Rifampicin-Transport eine Rolle spielen, sollte durch das Überprüfen von Mutanten, deren Eisenaufnahmesystem mutiert ist, bestätigt bzw. widerlegt werden (vgl. Anhang I). Da die getesteten Mutanten keinerlei erhöhte Resistenz gegenüber Rifampicin aufwiesen, scheint ein direkter Zusammenhang des Eisentransportsystems mit einer Rifampicin-Resistenz ausgeschlossen zu sein.

Tabelle 3 Rifampicin-Hemmung der RNA-Polymerase-Aktivität in Zell-extrakten von E. coli AB 1157, davon abgeleiteter Rifampicin-resistenter Mutanten und Transduktanten

Bakterienstamm	Einbau von [³² P] UMP in Gegen-wart von [0 µg/ml] bzw. [4 µg/ml] Rifampicin			Rifampicinkonzentration in [µg/ml] bei 50% Hemmung der RNA-Polymerase-Aktivität
	IpM	IpM	%	
AB 1157	1740	25	1	0.06
5/3	526	18	3	0.08
5/3 t	1702	112	7	0.08
5/3 t 2	441	339	77	4.00
7/3	1660	23	4	0.08
7/3 t	512	13	3	0.08
9/1	1611	24	2	0.08
9/1 t	247	17	7	0.08
10/1	566	37	7	0.08
10/1 t	757	45	6	0.08
10/1 t 2	941	67	7	0.08
10/2	1867	112	6	0.08
10/2 t	409	53	13	0.08
110	696	52	7	0.08
110 t	575	45	8	0.08

Die unterschiedliche Aktivität der RNA-Polymerase in den Extrakten ist wohl auf die unterschiedliche Protein- bzw. Enzymextraktion beim Aufschluß der einzelnen Mutanten zurückzuführen.

Gewinnung von Rifampicin-resistenten Mutanten mit dem Phagen Mu cIts Amp

Durch eine Insertion des Phagen Mu cIts Amp in das E. coli-Chromosom ist die Möglichkeit einer spezifischen Gewinnung von rpoB-unabhängigen Rifampicin-resistenten Mutanten gegeben, da bei Insertionen in den Genbereich der RNA-Polymerase-Untereinheiten die Zellen nicht lebensfähig sind. Die so gewonnenen Mu-lysogenen Rifampicin-resistenten Mutanten können für eine genetische Kartierung des Mutationsortes genutzt werden.

Durch Induktion des Mu-lysogenen Stammes E. coli DK 2646 wurde, wie auf Seite 13 beschrieben, ein Mu-Phagen-Lysat hergestellt. Bevor Rifampicin-resistente Mutanten isoliert wurde, wurde die allgemeine Mutagenisierungshäufigkeit mit dem Phagen Mu bestimmt. Dazu wurde der Stamm E. coli HfrH 165, wie auf den Seiten 13/14 beschrieben, mit dem Mu-Lysat infiziert und auf YT-Platten unter Zusatz von 20 µg/ml Ampicillin selektioniert. Zur quantitativen Erfassung aller auftretenden Auxotrophien wurden die selektionierten Einzelkolonien auf unsupplementiertes Minimalmedium, das 20 µg/ml Ampicillin enthielt, abgeimpft und das Wachstum nach 24 h bei 30°C kontrolliert (vgl. Seite 14).

Es zeigte sich, daß Auxotrophien mit einer Häufigkeit von 2-4% (Ansätze 1-4 der Tabelle 4) auftraten. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Literatur (Taylor, 1963; Bukhari, 1976), aus der hervorgeht, daß lysogene Überlebende Auxotrophien im Häufigkeitsbereich von 1-3% aufweisen.

Zur Isolierung von Rifampicin-resistenten Mutanten wurden 17 unabhängige Übernachtskulturen von E. coli HfrH 165 mit Mu, teilweise auf Platten, teilweise in Flüssigkultur direkt infiziert (Methodenteil Seite 13/14). Nach 8-12 Stunden wurde aus dem Plaque (Platte) eine Übernachtskultur mit Mu-lysogenen Zellen angelegt. Geeignete Verdünnungen dieser Übernachtskultur (10^{-2} - 10^{-7}) bzw. der direkt infizierten Flüssigkultur wurden auf YT-Platten, die 20 µg/ml Ampicillin enthielten, zur Bestimmung der Zellzahl der Mu-lysogenen Überlebenden ausgestrichen.

Durch Ausstreichen von 0.1 ml der oben genannten unverdünnten Übernachtskulturen auf YT-Platten unter Zusatz von 20 µg/ml Ampicillin und 120 µg/ml Rifampicin wurden Rifampicin-resistente Mu-lysogene Mutanten selektioniert.

Die Mu-Insertion (Mu-lysogene Überlebende) erfolgte durchschnittlich mit einer Häufigkeit von 3×10^{-2} auf der Platte bzw. 0.5×10^{-2} bei der Infektion in Flüssigkultur. Davon ausgehend trat die Mutation zur Rifampicin-Resistenz mit einer durchschnittlichen Häufigkeit von 0.2×10^{-6} bzw. 1×10^{-6} auf, während die Spontanmutationsrate mit durchschnittlich 1.9×10^{-8} im erwarteten Größenbereich lag. Rifampicin-resistente Mu-lysogene Mutanten entstanden somit ca. 10x häufiger als Spontanmutanten, bei denen es sich allerdings größtenteils nur um RNA-Polymerase-Mutanten handeln dürfte (Tabelle 4).

Tabelle 4 Häufigkeit der Mu-Insertion und der Mutation zur Rifampicin-Resistenz im Stamm E. coli HfrH 165

Ansatz Nr.	<u>E. coli</u> Hfr H 165 Übernacktkultur (Zellzahl/ml)	Zahl der unabhängigen Aliquots, die mit Mu infiziert wurden	Mu-lyogene Zellen, bestimmt durch Aus- streichen auf YT mit 20 µg/ml Amp Mittelwert der An- sätze aus c	(d)	(e= [d/b] x100)
(a)	(b)	(c)			
1	6.2×10^8	7 (infiziert auf Platte)	2.5×10^8 (Zellzahl pro ml)	40	
2	1.0×10^9	7 (infiziert auf Platte)	4.0×10^8 "	40	
3	1.0×10^9	2 (infiziert auf Platte)	3.0×10^8 "	30	
4	6.0×10^8	4 (infiziert in Flüssigkultur)	3.0×10^7 "	5	

Ansatz Nr.	Prozentsatz auxotropher Mu-lysogener Zellen	Zahl rif-resistenter Kolonien nach Aus- streichen von 1 ml Mu-infiz. Zellen (Mittelwert der An- sätze aus c)	Durchschnittl. Häufigkeit rif- resistenter Zel- len bez. auf Mu- lyogene Zellen	Spontan rif- res. Kolonien (Mittelwert der Ansätze aus c)	Durchschnittl. Häufigkeit der Spontanmutation zur Rifampicin- Resistenz
(a)	(f)	(g)	(h=g/d)	(i)	(K=i/b)

1	2	116	4.7×10^{-7}	20	3.2×10^{-8}
---	---	-----	----------------------	----	----------------------

2	2.5	44	1.1×10^{-7}	24	2.4×10^{-8}
---	-----	----	----------------------	----	----------------------

3	2.5	15	5.0×10^{-8}	0	0
---	-----	----	----------------------	---	---

4	4	28	1.0×10^{-6}	8	1.3×10^{-8}
Mittelwerte:			2.0×10^{-7}		1.9×10^{-8}

Der Titer der Mu-Lysate betrug durchschnittlich 10^8 PFU/ml. Es wurden jeweils 0.1 ml der Mu-lyso-
genen Übernachtskulturen auf YT-Platten mit 20 µg/ml Ampicillin und 120 µg/ml Rifampicin ausge-
strichen. Zur Bestimmung der Spontanmutationsrate wurden pro Ansatz 0.1 ml der nicht infizierten
E. coli HfrH 165 Übernachtskulturen auf YT-Platten mit 120 µg/ml Rifampicin ausgestrichen.

Die einzelnen Angaben zu den Ansätzen 1-4 beziehen sich auf Durchschnittswerte der jeweiligen An-
sätze. Folgende Mutanten wurden isoliert, deren Benennung aus historischen Gründen erfolgte:

1. Hfr Mu 1,2,3...7; 2. Mup 0/1, Mup 2/1, Mup 4/1, Mup 5/1, Mup 7/1; 3. Mup 120, Mup 520;

Charakterisierung der Mu-lysogenen Mutanten

Die isolierten und durch wiederholtes Ausstreichen von Einzelkolonien gereinigten Mutanten wurden auf ihre Mu-Lysogenität überprüft. Da es sich bei dem verwendeten Stamm um einen temperatursensitiven Mu-Phagen Mu cIts Amp handelte, kann durch eine Hitzeinduktion der Mutanten der Phänotyp der Rifampicin-Resistenz eindeutig auf die Gegenwart des inserierten Prophagen zurückgeführt werden. Aufgrund der nicht permissiven Temperatur von 42°C sollte eine gleichzeitige Rifampicin- und Ampicillin-Sensitivität der vorher resistenten Mutanten auftreten, da die Kontinuität des mutierten Gens durch eine exakte Exzision des Prophagen Mu wieder hergestellt werden kann (Bukhari, 1975). Im Normalfall läßt sich jedoch die Reversion der Mu-induzierten Mutation nicht beobachten, da die Wildtypfunktionen des Prophagen eine Lyse der Wirtszelle nach der Exzision von Mu durch die Hitzebehandlung bei 42°C zur Folge haben. Ein Ausbleiben des Wachstums von Mu-lysogenen Zellen bei der restriktiven Temperatur von 42°C ist somit nur vordergründig ein Beweis der Mu-Gegenwart innerhalb des Bakterienchromosoms, nicht aber spezifisch für den Rifampicin-Resistenz Genlocus. Die Durchführung des Versuchs ist auf Seite 15 beschrieben.

In allen Mutanten konnte die Mu-Gegenwart bestätigt werden, da keine der isolierten HfrH 165 Mu-lysogenen Mutanten bei 42°C auf YT-Platten in Gegenwart von 20 µg/ml Ampicillin und 120 µg/ml Rifampicin zu wachsen vermögen, während diese Mutanten bei der permissiven Temperatur von 30°C dazu in der Lage waren.

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für Rifampicin

Zur weiteren Charakterisierung der Mu-lysogenen Mutanten wurden die minimalen Hemmkonzentrationen für Rifampicin in M9-bzw. YT-Medium bestimmt (Tabelle 5).

Alle untersuchten Mutanten zeigten eine beträchtliche Steigerung des Resistenzfaktor beim Übergang vom Minimalmedium zum Vollmedium, womit sie sich deutlich vom Wildtyp unterscheiden, dessen minimale Hemmkonzentration, sowohl in M9-wie auch in YT-Medium, 10 µg/ml Rifam-

picin beträgt. Darüber hinausließ sich aber bei den einzelnen Mutanten eine gewisse Varianz der minimalen Hemmkonzentrationen feststellen, die sich in Bereichen von 20 bis 160 µg/ml in M9 und von 90 bis über 220 µg/ml Rifampicin in Vollmedium bewegt.

Tabelle 5 Minimale Hemmkonzentration für Rifampicin in M9- bzw. YT- Medium für den Ausgangsstamm E. coli HfrH 165 und dessen Rifampicin-resistente Mu-lysogene Mutanten

Bakterienstamm	Minimale Hemmkonzentration [µg/ml] Rifampicin		Resistenzfaktor	
	M9	YT	M9	YT
HfrH 165 (Wildtyp)	10	10	1	1
Hfr Mu 1	40	90	4	9
Hfr Mu 2	110	>220	11	>22
Hfr Mu 3	40	110	4	11
Hfr Mu 4	160	>220	16	>22
Hfr Mu 5	160	>220	16	>22
Hfr Mu 6	80	160	8	16
Hfr Mu 7	90	>220	9	>22
Mup 0/1	20	>220	2	>22
Mup 2/1	20	>220	2	>22
Mup 4/1	140	>220	14	>22
Mup 5/1	110	>220	11	>22
Mup 7/1	110	>220	11	>22
Mup 120	80	190	8	19
Mup 520	20	130	2	13
Mul 3	80	>220	8	>22
Mul 4	150	>220	15	>22
Mul 32	90	>220	9	>22

1 µl von Übernachtskulturen der Mutanten und des Wildtyps wurden auf M9- bzw. YT-Platten mit steigender Rifampicin-Konzentration ausgestrichen und bei 30°C 24 Stunden inkubiert.

Rifampicin-Empfindlichkeit der RNA-Polymerase

Schließlich wurde anhand der Rifampicin-Sensitivität der RNA-Polymerase im Rohextrakt der Mu-lysogenen Mutanten überprüft, ob der Phänotyp der Rifampicin-Resistenz eindeutig auf die Insertionsmutation eines vom *rpoB*-Gen unabhängigen Gens zurückzuführen ist (Tabelle 6). Die Durchführung erfolgte, wie bei Kollenda (1981) beschrieben, mit den auf Seite 15 erläuterten Änderungen.

Auffällig erschien der beträchtliche Unterschied in der Rifampicin-Konzentration, die zur 50% Hemmung der RNA-Polymerase-Aktivität nötig war; während bei der größeren Anzahl der Mutanten bereits Konzentrationen von weniger als 0.08 µg/ml Rifampicin ausreichten, wiesen andere Mutanten, wie Hfr Mu 5 und Mup 5/1, erst bei 1-4 µg/ml Rifampicin eine 50% Hemmung der RNA-Polymerase-Aktivität auf.

Drei der isolierten Mu-lysogenen Mutanten, Hfr Mu 2, Hfr Mu 7 und Mul 32, besaßen offensichtlich eine zur Insertion im Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gen zusätzliche Mutation im Gen der β -Untereinheit der RNA-Polymerase (*rpoB*-Mutante), welche zur Resistenz der RNA-Polymerase gegenüber Rifampicin geführt hatte. Diese Mutanten wurden von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Tabelle 6 Rifampicin-Hemmung der RNA-Polymerase-Aktivität in Zell-extrakten von E. coli HfrH 165 und dessen Mu-lysogene Rifampicin-resistente Mutanten

Bakterienstamm	Einbau von [³² P]UMP in Gegenwart von				Rifampicinkonzentration in [µg/ml] bei 50% Hemmung der RNA-Polymerase-Aktivität
	[0 µg/ml]		[4 µg/ml]		
	Rifampicin				
	RNA Pol. Klassif.	IpM	IpM	%	
HfrH 165	s	1796	215	12	0.08
Hfr Mu 1	s	1053	176	17	0.08
Hfr Mu 2	r	791	420	53	> 4.00
Hfr Mu 3	s	1109	194	18	0.20
Hfr Mu 4	s	816	215	26	0.80
Hfr Mu 5	hr	2431	917	38	1.00
Hfr Mu 6	s	1105	319	29	0.40
Hfr Mu 7	r	910	780	86	> 4.00
Mup 0/1	s	1215	153	13	0.40
Mup 2/1	s	1002	125	13	0.20
Mup 4/1	s	1785	92	5	0.10
Mup 5/1	hr	481	221	50	4.00
Mup 7/1	s	711	168	22	0.10
Mup 120	s	1771	179	10	0.08
Mup 520	hr	419	178	42	0.80
Mul 3	s	2785	761	27	0.50
Mul 4	s	1323	173	13	0.08
Mul 32	r	1326	980	70	> 4.00

Die Klassifizierung der Mutanten in RNA-Polymerase-Mutanten (r bzw. hr) und rpoB-unabhängige Mutanten (s) erfolgte allein im Hinblick auf die Restaktivität der RNA-Polymerase bei der eingesetzten Höchstkonzentration an Rifampicin von 4 μ g/ml und der ermittelten Rifampicin-Konzentration, bei der eine 50% Hemmung der RNA-Polymerase eintrat.

Fortsetzung der Tabelle 6

Nach folgendem Klassifizierungsschema erfolgte die Einteilung der Mutagenen Mutanten:

		Restaktivität bei	50% Hemmung bei
		[4 µg/ml] Rifampicin	[µg/ml] Rifampicin
sensitive RNA Polymerase	s	0- 30%	0-0.8
halbresistente RNA Pol.	hr	31- 50%	0.9-2.0
resistente RNA Pol.	r	51-100%	2.1-4.0

Genetische Kartierung der Mu-lysogenen Mutanten

Die durch Mu-Insertion erhaltenen Rifampicin-resistenten Mutanten, die eindeutig als rpoB-unabhängige Mutanten eingeordnet werden konnten, sollten durch Konjugationsexperimente Hinweise auf die Lokalisation des Resistenz-vermittelnden Gens innerhalb des E. coli-Genoms liefern.

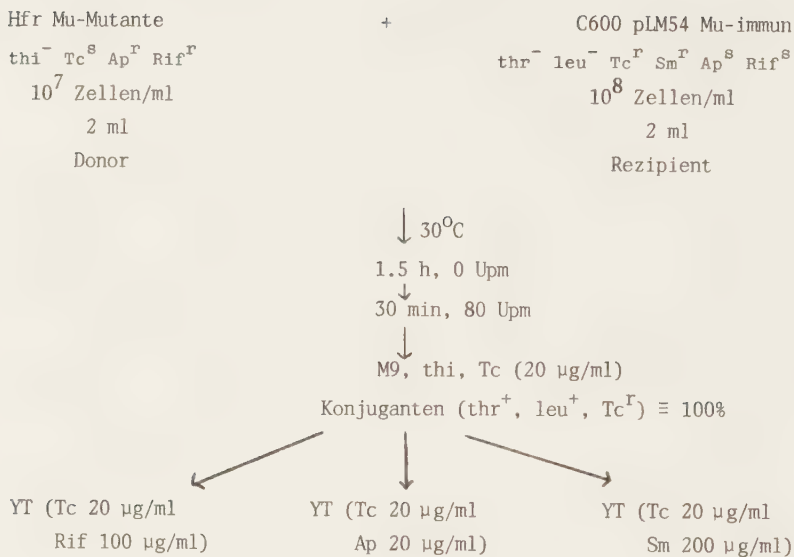
Kopplung der phagenkodierten Ampicillin- mit der Rifampicin-Resistenz

Die Voraussetzung der genetischen Kopplung, d. h. über den Phänotyp der in vivo auftretenden Resistenz hinaus, von Ampicillin-Resistenz, verursacht durch den Phagen Mu cIts Amp, und der Rifampicin-Resistenz, verursacht durch die Insertion des Prophagen in das für die Rifampicin-Resistenz verantwortliche Gen, sollte durch ein Konjugationsexperiment mit einem Mu-immunen Rezipientenstamm überprüft werden.

Bei dieser Art der Konjugation erfolgt ein Transfer des Prophagen Mu vom Donorstamm E. coli HfrH Mu-lysogene Mutanten (thr^+ , leu^+ , Tc^S , Ap^R , Sm^S , sowie Rif^R) in den Mu-immunen Rezipientenstamm E. coli C600 pLM54 (thr^- , leu^- , Tc^R , Ap^S , Sm^R , Rif^S), ohne daß der Prophage induziert wird, was bei einem sensitiven oder nicht lysogenen Rezipienten zur Induktion des Phagen und damit zur Lyse der Bakterienzellen führen würde (Miller, 1971; Faelen and Touissant, 1976). Somit werden alle durch den Hfr-Stamm transferierten chromosomalen genetischen Marker in der Rezipientenzelle auch exprimiert. Die so entstandenen Rekombinanten sollten die Gene für thr und leu aus dem Hfr-Stamm (0 bzw. 2 min der E. coli-Genkarte, nahe beim Ursprung des Stammes HfrH) und zugleich die Eigenschaft der Ampicillin- und Rifampicin-Resistenz übernommen haben. Zur Selektion gegen den Hfr-Donorstamm wird die Tetracyclin-Resistenz des Rezipientenstammes E. coli C600 pLM54 verwendet. Die zusätzliche Streptomycin-Resistenz (rpsL) bei Position 72 min des E. coli-Chromosoms (Bachmann and Low, 1980) des Rezipientenstammes konnte als genetischer Marker des Transfers des Prophagengenoms genutzt werden, da beim diploiden Satz der Gene Sm^S (von Hfr-Mutante) bzw. Sm^R (von C600 pLM54) in einer Rekombinanzelle die Sensitivität dominant ist (Jacoby and Gorini, 1967). Durch die quantitative Ermittlung der Kolonienanzahl der Streptomycin-sensitiven Konjuganten im

Vergleich zur Kolonienanzahl der Rifampicin-resistenten Konjuganten läßt sich der Genort der Rifampicin-Resistenz eindeutig vor bzw. hinter den der Streptomycin-Resistenz bei 72 min anordnen, d. h. die Zahl der Rifampicin-resistenten Kolonien ist größer bzw. kleiner als die Zahl der Streptomycin-sensitiven Kolonien.

Logarithmisch wachsende Kulturen der Mutanten Mup 2/1, Mup 4/1, Mup 120, Mul 4 und des Rezipientenstammes C600 pLM54 wurden im Verhältnis 1:10 bei 30°C ohne Schütteln 1.5 Stunden konjugiert, anschließend weitere 30 min unter leichtem Schütteln (80 UpM) inkubiert, und daraufhin wurden geeignete Verdünnungen des Konjugationsansatzes auf Platten mit unsupplementiertem Minimalmedium unter Zusatz von 20 µg/ml Tetracyclin und Thiamin ausgestrichen. Auf die Selektion des Markers thi der Hfr Mutanten wurde verzichtet, da es sich bei Vitamin-Auxotrophien meist um instabile Marker handelt (Hayes, 1968). Die Anzahl der selektionierten Rekombinanten (thr^+ , leu^+ , Tc^r) wurde als 100% definiert. Die so selektionierten Einzelkolonien wurden auf YT-Platten mit jeweils 20 µg/ml Tetracyclin und zusätzlich 20 µg/ml Ampicillin bzw. 100 µg/ml Rifampicin bzw. 200 µg/ml Streptomycin überimpft, um auf der einen Seite die Kolonienanzahl der Rifampicin-resistenten bzw. der Ampicillin-resistenten Rekombinanten, und auf der anderen Seite den Anteil der Streptomycin-sensitiven Rekombinanten zu bestimmen (Tabelle 7).



Man kann davon ausgehen, daß sich die Prozentzahl der Rifampicin-resistenten Konjuganten, bezogen auf die Gesamtzahl der Konjuganten (thr⁺, leu⁺, Tc^r ≅ 100%), um so mehr vermindern wird, je weiter das Rifampicin-Resistenz vermittelnde Gen vom Ursprung des HfrH Stammes (ca. bei 88 min, nahe thr, leu) entfernt liegt (Miller, 1972). Dabei sollte die Größenordnung der Kolonienanzahl der Rifampicin-resistenten Konjuganten den Grenzwert von 10% der Gesamtkonjugantenanzahl nicht unterschreiten, da eine genaue Bestimmung andernfalls nicht mehr gewährleistet ist (D. Kamp, persönliche Mitteilung).

Tabelle 7 Konjugation von HfrH Mu-lysogenen Rifampicin-resistenten Mutanten mit dem Mu-immunen Rezipientenstamm C600 pLM54

Bakterien- stamm	thr ⁺ leu ⁺ Tc ^r		Ap ^r		Rif ^r		Sm ^s	
	Kolonienanzahl	%	Kol.	%	Kol.	%	Kol.	%
Mup 2/1	250	100	60	24	72	29	20	8
Mup 4/1	250	100	43	17	45	18	24	9
Mup 120	350	100	122	35	98	28	50	14
Mu1 4	100	100	32	32	26	26	12	12
Mittelwerte:				27		25		10

Aufgrund der nahezu übereinstimmenden Prozentzahlen der Ampicillin-resistenten (durchschnittlich 27%) bzw. der Rifampicin-resistenten Konjuganten (durchschnittlich 25%) sind das Ampicillin-Resistenzgen des Phagen Mu und das Rifampicin-Resistenzgen aus E. coli offenbar eng gekoppelt. Durch dieses genetische Experiment ist die Rifampicin-Resistenz der Mutanten eindeutig auf die Insertion des Phagengenoms zurückgeführt und ist nicht durch eine Mutation im rpoB-Gen (Locus der β -Untereinheit der RNA-Polymerase) bedingt.

Zugleich erlaubt es der quantitative Vergleich der Streptomycin-sensitiven Konjuganten (durchschnittlich 10%) mit dem der Rifampicin-resistenten Konjuganten (25%), den Mu-Insertionsort sicher vor den Genort der Streptomycin-Resistenz bei 72 min zu legen, d. h., das Rifampicin-Resistenz vermittelnde Gen muß sich im Bereich von 2-72 min (leu-rpsL) innerhalb des E. coli-Genoms befinden.

Kartierung mit Auxotrophienmarkern

Beim konjugativen Transfer eines Prophagen in einen sensitiven, nicht lysogenen Rezipientenstamm wird der Prophage teilweise induziert und beginnt zu replizieren. Die entstehenden Phagen wiederum führen zu einer Zerstörung der Rezipientenzelle durch Lyse (Daniell et al., 1972; Jacobs and Wollman, 1961). Lyse und Freisetzen der Phagen tritt um so häufiger auf, je näher der Insertionsort des Prophagen im bakteriellen Chromosom dem Hfr-Ursprung liegt. Genetische Marker des Donors (Hfr), die nach dem Insertionsort des Prophagen auf dem E. coli-Chromosom lokalisiert sind, werden im Vergleich zu davorliegenden Markern infolge der Induktion des Prophagen mit einer deutlich verminderten Frequenz übertragen, wobei der Abfall der Rekombination gegenüber Markern vor dem Prophagen um so eindrucksvoller ist, je näher der selektionierte Marker in Nachbarschaft zum inserierten Prophagen liegt. Dieser Effekt der zygotischen Induktion kann zur Bestimmung des Prophagen-Insertionsortes und im vorliegenden Fall zur Lokalisation von Mu und damit des Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gens herangezogen werden (Miller, 1972; Hayes, 1968).

Es wurden vier Mu-lysogene Rifampicin-resistente Mutanten, Mup 2/1, Mup 120, Mul 4, Hfr Mu 1 ausgewählt und nachfolgend mit sechs Mu-sensitiven auxotrophen Rezipientenstämmen (E. coli CGSC 4517 mit lacY1 (8 min), E. coli AB 1157 mit galk2 (17 min), E. coli CGSC 6041 mit aroA (20 min), E. coli 223 mit cysB (29 min), E. coli AB 1369 mit cysB (28 min) und E. coli AB 1360 mit aroD6 (37 min)], deren genetische Marker im Bereich 1 bis 72 min, dem Ort der Streptomycin-Resistenz, des E. coli-Chromosoms lagen, konjugiert. Als Kontrolle diente der Wildtypstamm HfrH 165.

Die Durchführung erfolgte, wie auf Seite 16 beschrieben.

Zunächst wurden die Konjuganten nach der Komplementation des frühesten Markers des jeweiligen Rezipientenstammes selektioniert. Dies sind die Marker ara (1 min), thr/leu (0/2 min), pro (6 min) und lacY (8 min). Dazu wurden Verdünnungen des Konjugationsansatzes auf Minimalmedium, das, bis auf den diesem Marker entsprechenden Zusatz, alle sonstigen zum Wachstum des Rezipientenstammes notwendigen Substanzen und zusätzlich Glucose enthielt, ausgestrichen. Jeweils 104 der ge-

wachsenen Kolonien wurden anschließend auf Minimalmedium (M9) überimpft; zur quantitativen Auswertung der Komplementation der einzelnen Auxotrophien enthielt das M9-Medium einmal alle notwendigen Aminosäuren, mit Ausnahme der zu überprüfenden Auxotrophie, bzw. alle zur Supplementation nötigen Aminosäuren bei gleichzeitigem Austausch der üblichen Kohlenstoffquelle Glucose durch den entsprechenden Zuckerzusatz (Tabellen 8 bis 13).

Tabelle 8 Zygotische Induktion der Mu-lysogenen Rifampicin-resistenten Mutanten mit dem Rezipientenstamm E. coli CGSC 4517

Selekt. genet. Marker	Pos. min	HfrH 165		Mup 2/1			Mup 120			Mud 4			Hfr Mu 1		
		K	%	K	%	R	K	%	R	K	%	R	K	%	R
ara	1	104	100	104	100	1	104	100	1	104	100	1	104	100	1
lac	8	96	92	99	95	1	92	88	0.95	96	92	0.95	94	90	0.97
his	44	34	32	5	5	0.15	3	3	0.09	4	4	0.11	5	5	0.04
pur F	49	30	29	3	3	0.1	2	2	0.07	1	1	0.03	0	0	0
malA	75	16	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0.12
xy1	79	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mt1	80	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
arg	89	2	2	2	2	0.16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pyr	96	12	12	2	2	0.16	3	3	0.25	0	0	0	1	1	0.08

Legende: K=Kolonienanzahl, %=Rekombinanten, bezogen auf die Kolonienanzahl (104) beim frühesten Marker des Rezipientenstammes, ausgedrückt in Prozent. Für die frühesten Marker thr, leu, ara (lokalisiert zwischen 0-2 min) wurden diese zu 100%, für pro (6 min) zu 94% und für lacY (8 min) zu 92% gesetzt; R=Verhältnis der Kolonienanzahl, beobachtet mit HfrH 165 beim gleichen Marker.

Tabelle 9 Zygotische Induktion der Mu-lysoenen Rifampicin-resistenten Mutanten mit dem Rezipientenstamm AB 1157

Selekt. genet. Marker	Pos. min	HfrH 165		Mup 2/1		Mup 120		MuL 4		Hfr Mu 1	
		K	%	K	%	K	%	K	%	K	%
thr/leu	0/2	104	100	104	100	1	104	100	1	104	100
ara	1	104	100	104	100	1	104	100	1	104	100
pro	6	74	71	75	72	1	59	57	0.79	83	80
lac	8	100	96	57	55	0.57	84	81	0.84	86	83
gal	17	61	58	41	39	0.67	48	46	0.78	51	49
his	44	27	26	8	7	0.29	7	6	0.26	9	8
xyI	79	7	6	1	1	0.14	0	0	0	1	1
arg	89	6	5	1	1	0.14	0	0	0	0	0
										1	0.16

Legende: K=Kolonienanzahl; %=Rekombinanten, bezogen auf die Kolonienanzahl (104) beim frühesten Marker des Rezipientenstammes, ausgedrückt in Prozent. Für die frühesten Marker thr, leu, ara (lokalisiert zwischen 0-2 min) wurden diese zu 100%, für pro (6 min) zu 94% und für lacy (8 min) zu 92% gesetzt; R=Verhältnis der Kolonienanzahl, beobachtet mit HfrH 165 beim gleichen Marker.

Tabelle 10 Zytotische Induktion der Mu-lysoenen Rifampicin-resistenten Mutanten mit dem Rezipientenstamm E. coli CGSC 6041

Selekt. genet. Marker	Pos. min	HfrH 165		Map 2/1		Map 120		Mal 4		Hfr Mu 1	
		K	%	K	R	K	R	K	%	K	R
lacY	8	104	92	104	92	1	104	92	1	104	92
proC	9	104	92	104	92	1	104	92	1	104	92
purE	12	94	83	77	68	0.82	80	70	0.85	86	76
aroA	20	85	75	74	65	0.87	59	52	0.69	64	56
his	44	29	25	1	1	0.03	2	2	0.06	1	1
xy1	79	17	15	4	4	0.23	0	0	0	0	0
ilv	84	12	10	1	1	0.08	0	0	0	0	0

Legende: K=Kolonienanzahl; %=Rekombinanten, bezogen auf die Kolonienanzahl (104) beim frühesten Marker des Rezipientenstammes, ausgedrückt in Prozent. Für die frühesten Marker thr, leu, ara (lokalisiert zwischen 0-2 min) wurden diese zu 100%, für pro (6 min) zu 94% und für lacY (8 min) zu 92% gesetzt; R=Verhältnis der Kolonienanzahl, beobachtet mit HfrH 165 beim gleichen Marker.

Tabelle 11 Zygotische Induktion der Mu-lysoenen Rifampicin-resistenten Mutanten mit dem Rezipientenstamm E. coli 223

Selekt. genet. Marker	Pos. min	HfrH 165	Map 2/1		Map 120		Mu1 4		Hfr Mu 1	
		K &	K	%	R	K	%	R	K	%
pro	6	104	94	104	94	1	104	94	1	104
lac	8	93	89	104	94	1	104	94	1	104
galT	17	54	49	53	48	1	43	39	0.79	51
trp	27	49	44	36	33	0.73	41	37	0.83	46
cysB	28	43	39	34	31	0.79	38	34	0.88	45
his	44	39	35	8	7	0.2	6	5	0.15	12
argA	60	26	23	4	4	0.15	1	1	0.03	0
mala	75	22	20	2	2	0.09	2	2	0.09	0
xyl	79	14	12	1	1	0.07	0	0	0	0
ilvA	84	10	9	1	1	0.1	1	1	0.1	1

Legende: K=Kolonienanzahl; %=Rekombinanten, bezogen auf die Kolonienanzahl (104) beim frühesten Marker des Rezipientenstammes, ausgedrückt in Prozent. Für die frühesten Marker thr, leu, ara (lokalisiert zwischen 0-2 min) wurden diese zu 100%, für pro (6 min) zu 94% und für lacy (8 min) zu 92% gesetzt; R=Verhältnis der Kolonienanzahl, beobachtet mit HfrH 165 beim gleichen Marker.

Tabelle 12 Zygotische Induktion der Mu⁻lysogenen Rifampicin-resistenten Mutanten mit dem Rezipientenstamm E. coli AB 1369

Selekt. genet. Marker	Pos. min	HfrH 165		Map 2/1		Map 120		Mu11 4		Hfr Mu 1	
		K	%	K	%	K	%	K	%	K	%
proA	6	104	94	104	94	1	104	94	1	104	94
lacY	8	102	92	104	94	1	102	92	1	102	92
galK	17	74	66	52	47	0.7	38	34	0.5	55	49
cysB	28	57	51	31	28	0.54	33	30	0.57	34	30
his	44	46	41	5	4	0.1	6	5	0.13	5	4
xy1	79	4	3	1	1	0.25	0	0	0	0	0
argE	89	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0

Legende: K=Kolonienanzahl; %=Rekombinanten, bezogen auf die Kolonienanzahl (104) beim frühesten Marker des Rezipientenstammes, ausgedrückt in Prozent. Für die frühesten Marker thr, leu, ara (lokalisiert zwischen 0-2 min) wurden diese zu 100%, für pro (6 min) zu 94% und für lacY (8 min) zu 92% gesetzt; R=Verhältnis der Kolonienanzahl, beobachtet mit HfrH 165 beim gleichen Marker.

Tabelle 13 Zygotische Induktion der Mu-lyso gene Rifampicin-resistenten Mutanten mit dem Rezipientenstamm E. coli AB 1360

Selekt. genet. Marker	Pos. min	HfrH 165		Mup 2/1		Mup 120		Mul 4		Hfr-Mu 1	
		K	%	K	%	K	%	K	%	K	%
proA	6	104	94	104	94	104	94	104	94	104	94
lacY	8	100	91	102	92	99	89	100	90	100	90
galK	17	62	56	59	53	60	54	28	25	31	28
aroD	37	43	39	6	5	4	4	7	6	2	2
his	44	14	13	4	4	0	0	3	3	0	0
xy1	79	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
argE	89	5	4	0	0	1	1	2	2	1	1

Legende: K=Kolonienanzahl; %=Rekombinanten, bezogen auf die Kolonienanzahl (104) beim frühesten Marker des Rezipientenstammes, ausgedrückt in Prozent. Für die frühesten Marker thr, leu, ara (lokalisiert zwischen 0-2 min) wurden diese zu 100%, für pro (6 min) zu 94% und für lacY (8 min) zu 92% gesetzt; R=Verhältnis der Kolonienanzahl beobachtet mit HfrH 165 beim gleichen Marker.

Es zeigte sich, daß alle vier untersuchten Mutanten übereinstimmend einen deutlichen Abfall der Komplementierbarkeit beim Marker his (44 min) aufwiesen (Tabellen 8-13). Es wurde eine deutliche Abnahme der Kolonienanzahl im Vergleich zum Wildtyp HfrH (Kontrolle) nach den Markern lacY (8 min) (CGSC 4517, Tabelle 8), galK (17 min) (AB 1157, Tabelle 9), araA (20 min) (CGSC 6041, Tabelle 10), cys B (28 min) (223, Tabelle 11 und AB 1369, Tabelle 12) und vor den nachfolgenden Markern aroD (37 min) (AB 1360, Tabelle 13) bzw. his (44 min) (alle Rezipientenstämme, Tabellen 8-13) beobachtet.

Die Verhältnisse (R) der Rekombinanten-Kolonienanzahl der Mutanten zur Kolonienanzahl der Kontrolle (HfrH unter gleichen Bedingungen) sank bei allen vier untersuchten Mutanten bei dem Marker his (44 min) auf Werte um meist 0.1 ab, während der davorliegende Marker cysB bei 28 min noch mit einem Verhältnis R von durchschnittlich 0.78 deutlich gut vererbt wurde, was auf eine Induktion des Prophagen Mu vor der Position bei 44 min hinwies. Dieses Ergebnis wurde noch durch die Konjugation mit dem Stamm AB 1360 (Tabelle 13) ergänzt, indem der Insertionsort von Mu aufgrund des Markers aroD bei 37 min so weit bestimmt werden konnte, daß der Phage auch vor der Position bei 37 min inseriert sein muß, da auch dieser Marker mit einer deutlich geringeren Frequenz vererbt wurde (R besitzt Werte um 0.1). Die beiden verfügbaren, offensichtlich am nächsten distal zum Prophagen gelegenen Marker his (44 min) und aroD (37 min) wurden jeweils mit durchschnittlich 4.8 bzw. 4.3% deutlich vermindert rekombiniert als beim Wildtyp HfrH 165, bei dem die Rekombination der beiden Marker immerhin noch bei ca. 30% lag (Tabellen 8-13).

Der prozentuale Abfall der Vererbbarkeit beider Marker ist nahezu übereinstimmend, d. h., der folglich näher zum Prophageninsertionsort lokalisierte Genort des Markers aroD (37 min) machte sich gegenüber dem doch 7 min später gelegenen his-Marker nicht mit einer verstärkten Reduktion der Rekombinanten-Kolonienanzahl bemerkbar. Damit liegt es nahe, den Insertionsort von Mu deutlich vor dem aroD Marker bei 37 min zu vermuten, da bei der Prophageninsertion sehr nahe bei 37 min ein stärkerer Abfall der Kolonienanzahl zu erwarten wäre.

Die allgemein abnehmende Kolonienanzahl des Kontrollstammes HfrH 165 im zeitlichen Verlauf der genetischen Marker ist auf den natürlichen Transmissionsgradienten der Marker zurückzuführen, da Marker mit ab-

nehmender Wahrscheinlichkeit transferiert werden, je weiter sie sich vom Ursprung des Hfr-Stammes befinden (HfrH-Ursprung bei ca. 88 min) (Miller, 1972).

Aufgrund der Daten aller Kartierungsexperimente (Tabellen 7 bis 13) kann man nun den Prophagen-Insertionsort und damit die Lokalisation der Mutation zur Rifampicin-Resistenz zwischen den Genorten *cysB* (28 min) und *aroD6* (37 min) ansiedeln.

Kartierung durch Kotransduktion

Im Verlauf einer Transduktion agiert ein Bakteriophage wie P1 als genetischer Vektor, der bakterielle Eigenschaften von einem Bakterienstamm zu einem anderen transferiert. Eng benachbarte Marker auf der E. coli-Genkarte werden hierbei kotransduziert, da sie vom selben P1-Phagen übermittelt werden können. Somit dient die Frequenz der Kotransduktion zweier Marker zur Abschätzung ihres Abstandes auf dem Chromosom.

Bei Anwendung dieses Systems im allgemeinen und speziell im vorliegenden Fall der Kotransduktion der Rifampicin-Resistenz mit benachbarten Markern muß man sich jedoch der Problematik bewußt sein. Der P1-Phage ist durch eine limitierte DNA-Transfer-Kapazität, die ca. 6×10^7 Daltons (ca. 90 000 bp), was etwa 2 min des E. coli-Chromosoms entspricht, gekennzeichnet; wenn man allein die inserierte Mu-DNA mit einer Größe von 38 000 bp (2.5×10^7 D, ca. 1% des E. coli-Chromosoms) annimmt (Bukhari, 1976), so ist die Wahrscheinlichkeit einer Kotransduktion von angrenzenden genetischen Markern weitgehend herabgesetzt. Zudem ist die längste Distanz zweier Marker, die noch durch P1 kotransduziert werden können, bei 2.2 min der Genkarte und bereits mit einer Frequenz von nur 0.3% (Caro and Berg, 1971) in einem kaum noch erfassbaren Bereich.

Da der genaue Genort der Mutation unbekannt ist, ist es durchaus möglich, daß sich die Insertion des Phagen Mu außerhalb der Kotransduktionsgrenze der zur Verfügung stehenden Marker von 27, 28 bzw. 37 min, also > 30 min und < 35 min, befindet.

Auf der anderen Seite sinkt ebenfalls die Häufigkeit einer Kotransduktion mit dem Abstand des Gens vom Replikationsursprung (Masters, 1977; Bade et al., 1978), was sich für eine zu transduzierende Mutation bei 28 bis 37 min bereits beträchtlich auswirken mag.

Darüber hinaus ist die Genkarte von Escherichia coli in dem Bereich von 30 bis 35 min durch einen auffälligen Mangel an genetischen Markern und eine Kotransduktionslücke bei 32/33 min gekennzeichnet (Bachmann and Low, 1980), und somit könnte eine Mutation in diesem Bereich für eine Kartierung durch Kotransduktion bzw. zygotische Induktion nicht zugänglich sein.

Zur weiteren Feinkartierung der Mu-lysogenen Rifampicin-resistenten Mutanten wurden Kotransduktionsexperimente mit dem Phagen Pl Cmts100, der das Gen der Chloramphenicol-Resistenz enthält (Rosner, 1972), und den Rezipientenstämmen E. coli 223 (cysB, 28 min), E. coli CGSC 4539 (pyrF, 28 min), E. coli AB 1360 (aroD6, 37 min) und E. coli CGSC 5364 (trp, 27.5 min) durchgeführt (Methodenteil Seite 17).

Die oben genannten Rezipientenstämmen wurden mit Pl-Lysaten der Mutanten Mup 120, Mup 4/1, Mup 7/1 und Mul 4 infiziert und auf supplementiertem M9-Medium, dem nur der zu selektionierende Marker-Zusatz fehlte, aber 20 µg/ml Chloramphenicol und 30 µg/ml Rifampicin enthielt, ausgestrichen. Die Kontrolle mit dem Wildtypstamm E. coli HfrH 165 ergab, daß prototrophe, temperatursensitive, Chloramphenicol-resistente Transduktanten gewonnen werden konnten. Jedoch auch nach wiederholtem Ansatz konnten unter Verwendung der Pl-Lysate der Mu-lysogenen Mutanten keine Transduktanten erhalten werden, deren Anzahl über die Spontanmutationsrate hinausging.

Aus diesem Befund läßt sich nun im Hinblick auf das zu Beginn Erläuterte ableiten, daß der Insertionsort von Mu in dem Bereich von etwa 30 bis 35 min liegt, der bei der Kotransduktion mit dem Phagen Pl nicht erfaßt werden kann.

Zellmembrananalyse der Mu-lysogenen Mutanten

Die Untersuchung der inneren und äußeren Membran der durch die Insertion von Mu mutagenisierten Bakterienstämme sollte übereine etwaige Veränderung im Membranaufbau Aufschluß geben.

Die Isolierung und Trennung der Membranen erfolgte nach dem bei Kollenda (1981) beschriebenen Verfahren.

Obwohl bei der Färbemethode der SDS/PAA-Gele mit Fast Green FCF Proteine in Konzentrationen von 150 µg pro Gelbahn (Gorovsky et al., 1970) entdeckt werden können, ergeben sich Schwierigkeiten durch die Zusammensetzung der Membranen selbst, da infolge der Vielzahl von Proteinen eine Auflösung der Banden und damit die Zuordnung erschwert wird. Fraktionen der äußeren Membran zeigen in SDS/PAA-Gele ca. 20 Proteinbanden (Schnaitman, 1970 a; Kadner and Bassford Jr., 1978), doch weitaus unübersichtlicher gestaltet sich das Bandenmuster der inneren Membranfraktion, wo ca. 40-50 unterschiedliche Proteine beobachtet werden (Schnaitman, 1970 b; Spencer and Guest, 1974). Auch wenn Proteine, deren Anteil weniger als 1% des Gesamtzellproteins beträgt, prinzipiell erfaßt werden können (Ames, 1974), liegen Proteine mit geringerem Anteil außerhalb dieser Nachweisgrenze.

Bei der gelelektrophoretischen Analyse der Membranfraktionen der Mu-lysogenen Mutanten konnten im Vergleich zum Wildtyp HfrH 165 keine Veränderungen im Proteinmuster durch Fehlen einzelner Banden festgestellt werden.

Auch bei der empfindlicheren Färbemethode der Silverstain-Behandlung der SDS/PAA-Gele, wobei Proteine in einer Konzentration von 30 ng/ml noch gut nachweisbar sind (Poehling and Neuhooff, 1981), waren Unterschiede nicht erkennbar (ohne Beleg).

Offenbar wird ein Verschwinden von Proteinzonen im Proteinmuster der Mu-lysogenen Mutanten durch eine Vielzahl der Banden im Gel überdeckt bzw. scheint das synthetisierte Protein des intakten Gens im Wildtyp HfrH 165 in nur verschwindend geringen Mengen vorhanden zu sein.

Charakterisierung von E. coli mit kloniertem Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gen

Zur Erfassung des Genprodukts des Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gens wurde dieses Gen aus den E. coli-Mutanten 5/3 und 10/1 t kloniert. Die Selektion der Klone erfolgte auf YT-Agar, der 50 µg/ml Rifampicin enthielt. Plasmide, die das Gen in pBR 322 als Insert enthielten, wurden mir von Herrn P. Heinrich zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um die von der Mutante 5/3 abgeleiteten Plasmid-Klone 1m, 1j, 3b, 4g, 3t, 3y sowie um die von der Transduktante 10/1 t abgeleiteten Klone 1u, 1b, 2f, 3d, 4d. Sie sind im Wirt E. coli DH1 enthalten.

Um sicherzustellen, daß alle mir überlassenen Klone den vorausgesetzten Kriterien entsprachen, wurden sie in verschiedener Hinsicht charakterisiert.

Minimale Hemmkonzentration für Rifampicin

Übernachtskulturen aller oben genannten Klone wurden auf M9- bzw. YT-Platten mit steigenden Rifampicin-Konzentrationen ausgestrichen und die Konzentration bestimmt, bei der ein Bakterienwachstum nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C ausblieb (Tabelle 14).

Alle isolierten Klone zeigten im Vergleich zu den Donorstämmen 5/3 und 10/1 t eine bemerkenswerte Steigerung des Resistenzfaktors, sowohl in Vollmedium als auch in Minimalmedium. Die bei den Mutanten, Transduktanten und Mu-lysogenen Mutanten signifikanten Unterschiede im Resistenzverhalten in Abhängigkeit des Nährmediums treten bei den Klonen eher in den Hintergrund, d. h., Resistenzfaktoren in M9 und YT stimmen weitgehend überein. Die Resistenzfaktoren der vom Donorstamm 5/3 abgeleiteten Klone besaßen im wesentlichen vergleichbare Werte mit denen der vom Donorstamm 10/1 t abgeleiteten Klone, obwohl die minimale Hemmkonzentration des Stammes 5/3 mit 55 µg/ml in M9 deutlich unter der von 160 µg/ml für den Stamm 10/1 t liegt.

Weiterhin gilt festzustellen, daß es für die Größenordnung der Resistenz unbedeutend ist, in welchem der untersuchten Bakterienstämme (HB101, DH1, DS410) sich das Plasmid befindet, da ungeachtet des

Wirts-Bakterienstammes die mit den einzelnen Plasmiden ermittelten Resistenzfaktoren übereinstimmen.

Tabelle 14 Minimale Hemmkonzentration für Rifampicin der Klone der E. coli-Stämme 5/3 und 10/1 t im Wirtsstamm DH1

Bakterienstamm	Minimale Hemmkonzentration [µg/ml] Rifampicin		Resistenzfaktor	
	M9	YT	M9	YT
<u>E. coli</u> DH1	10	10	1	1
5/3	55	70	5.5	7
1m	> 250	> 250	> 25	> 25
1j	160	180	16	18
3b	250	250	25	25
4g	185	200	18.5	20
3t	250	250	25	25
3y	> 250	> 250	> 25	> 25
10/1 t	160	200	16	20
1u	> 250	> 250	> 25	> 25
1b	> 250	> 250	> 25	> 25
2f	250	> 250	25	> 25
3d	250	> 250	25	> 25
4d	195	190	19.5	19

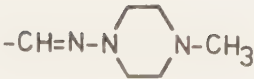
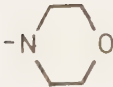
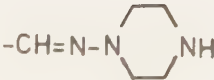
Zum gleichen Ergebnis der minimalen Hemmkonzentrationen gelangt man bei Verwendung der Wirtsstämme HB101 oder DS410; beide Wildtypstämme besitzen in YT wie auch in M9 eine minimale Hemmkonzentration von jeweils 10 µg/ml Rifampicin.

Resistenz gegenüber Rifamycin-Derivaten

Ergänzend zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen für Rifampicin wurde das Wachstumsverhalten einiger Mutanten auf YT-Platten mit unterschiedlichen Rifamycin-Derivaten untersucht.

Hierzu wurde jeweils 1 μ l einer Übernachtskultur der Stämme 5/3, 10/1 t, DS410/3t, DH1/2f, Mup 120 und Mul 4 auf YT-Platten, die je 50 μ g/ml des Antibiotikums enthielten, ausgestrichen und 24 Stunden bei 30°C inkubiert.

Es zeigte sich, daß alle getesteten Stämme in der Lage waren, in Gegenwart von unterschiedlichen Rifamycin-Derivaten (Demethylrifampicin, Rifamycin SV, Rifamycin B, N-Morpholinorifamycin, 3-Isopropylaminorifamycin SV, 7-Methyl-ROAP) zu wachsen; - eine spezifisch für das Rifamycin-Derivat Rifampicin (vgl. Fig. 1) ausgeprägte Resistenz kann somit ausgeschlossen werden.

Derivat	R1 (C ₃)	R2 (C ₄)
Rifampicin		-OH
Rifamycin SV	-H	-OH
Rifamycin B	-H	-OCH ₂ COOH
3-Morpholinorifamycin		-OH
Demethylrifampicin		-OH

Rifampicin-Empfindlichkeit der RNA-Polymerase

Um RNA-Polymerase-Mutanten auszuschließen, wurde die Empfindlichkeit der RNA-Polymerase-Aktivität gegenüber Rifampicin der isolierten Klone im Rohextrakt überprüft.

Anhand der Daten der 50%-Hemmung der RNA-Polymerase-Aktivität bei meist 0.08 µg/ml Rifampicin, ersichtlich aus Tabelle 15, konnten die Klone den rpoB-unabhängigen Mutanten zugeordnet werden.

Transformierbarkeit der Rifampicin-Resistenz

Die notwendige Voraussetzung der wiederholten Transformierbarkeit der Rifampicin-Resistenz aller Plasmide wurde getestet, indem die gereinigten inserthaltigen Plasmide in die Stämme DH1, HB101 und DS410 transformiert wurden (Methodenteil Seite 21) und die auf YT/Ampicillin (50 µg/ml) selektierten Klone durch Einzelüberimpfung auf ihre Rifampicin-Resistenz überprüft wurden.

In allen Fällen konnten Rifampicin-resistente Transformanden erhalten werden, deren Plasmide im Schnellaufschluß das BamHI-Restriktionsmuster der eingesetzten Plasmide zeigten (ohne Beleg).

Tabelle 15 Rifampicin-Hemmung der RNA-Polymerase-Aktivität in Zellextrakten der E. coli-Stämme DH1 bzw. DS410 mit und ohne kloniertes Rifampicin-Resistenz vermittelndes Gen

Bakterienstamm	Einbau von [32 P] UMP in Gegenwart von			Rifampicinkonzentration in [μ g/ml] bei 50% Hemmung der RNA-Polymerase-Aktivität
	[0 μ g/ml]	[4 μ g/ml]		
	IpM	IpM	%	
DS410	1736	22	1	< 0.08
DS410/pBR 322	808	253	31	0.08
1u	818	314	38	0.4
1b	823	84	10	0.08
2f	1103	224	20	0.08
3d	1101	285	25	0.4
DH1	4858	715	15	0.08
4d	1850	98	5	0.08
1j	2699	373	14	0.08
3b	3275	372	11	0.1
3t	1643	16	1	0.08
4g	1254	18	1	0.1

Die Aktivitäten der RNA Polymerase, ausgedrückt in Impulsen pro Minute, erhält man nach Abzug des Leerwertes von durchschnittlich 120 IpM. Dieser Leerwert, d. h. ein Inkubationsansatz ohne Zusatz von Rohextrakt, kann jedoch weitere Inkorporationsaktivitäten der einzelnen Ansätze nicht korrigieren. Für die Zuordnung der Klone zu RNA-Polymerase unabhängigen Mutanten war vor allem die Rifampicin-Konzentration der 50%igen Aktivitätshemmung entscheidend, die mit Ausnahme von 1u und 3d bei allen Klonen in der gleichen Größenordnung liegt.

Längenbestimmung der klonierten chromosomalen DNA-Fragmente

Eine Längenbestimmung (in bp) der klonierten chromosomalen DNA-Fragmente aller inserthaltigen Plasmide sollte über die strukturelle Größe des für die Codierung des Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gens Auskunft geben.

Die inserthaltigen Plasmide wurden isoliert und die Fragmente durch Hydrolyse mit BamHI herausgeschnitten. Die Analyse erfolgte auf 0.8% Agarosegelen unter Verwendung von HindIII geschnittener Ad5-DNA als Größenmarker (Tabelle 16, Fig. 2).

Tabelle 16 Längenbestimmung (in bp) der chromosomalen DNA-Fragmente der inserthaltigen Plasmide aus Rifampicin-resistenten Klonen

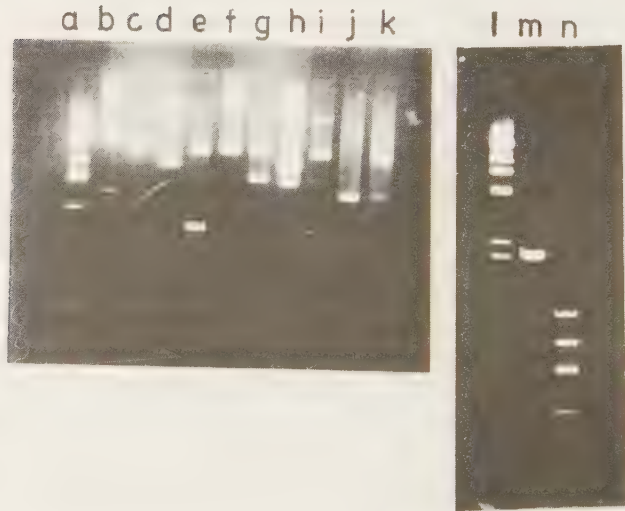
Plasmid	Fragmentgröße bp
1u	1800
1b	2900
2f	1800
3d	2000
4d	2100
1m	2000
1j	2000
3b	1900
3t	1800
4g	1900
3y	2800

Ad5-DNA wurde mir von Frau Gudrun Kausel zur Verfügung gestellt.

Nahezu alle Fragmente besitzen eine Größe von ca. 2000 bp $\pm$ 200 bp. Nachdem auch die kleinsten Fragmente 1u und 2f mit einer Länge von ca. 1800 bp die vollständige Einheit des Gens, d. h. die Promotersequenz (Pribnow-Box, Shine-Dalgarno-Sequenz), eventuell eine leadersequenz, beeinhalteten, da auch sie bei einer wiederholten Transformation (vgl. Seite 60) Rifampicin-Resistenz in einer vorher sensitiven Bakterienzelle vermitteln, kann man davon ausgehen, daß das Strukturgen maximal eine Länge von 1800 bp umfaßt.

Zusätzliche Sequenzen der größeren Fragmente, z. B. 1b, 3y (2900 bzw. 2800 bp), scheinen sich phänotypisch, d. h. bei den Klonen, die diese Plasmide enthalten, nicht auszuwirken, da sich diese bezüglich der Resistenzfaktoren und der RNA-Polymerase-Aktivität von Klonen mit Plasmiden kleinerer chromosomaler DNA-Fragmente nicht unterscheiden (vgl. Tabelle 14 und 15).

Fig. 2 Längenbestimmung der klonierten chromosomalen DNA-
Fragmente der Plasmide 1u, 1b, 2f und 3d



a = Ad5 DNA/HindIII
b = pBR 322
c = pBR 322/BamHI
d = 1u
e = 1u/BamHI
f = 1b
g = 1b/BamHI

h = 2f
i = 2f/BamHI
j = 3d
k = 3d/BamHI
l = λ DNA/HindIII
m = 3d, isoliertes Fragment
n = Φ X174 DNA/HaeIII

Restriktionsfragmente von Ad5- DNA
HindIII: A 8172 F 2880
 B 6012 G 2844
 C 5220 H 2088
 D 4608 I 1044
 E 3276

Restriktionsfragmente von λ -DNA
HindIII: A 23130 E 2322
 B 9419 F 2028
 C 6557 G 564
 D 4371 H 125

Restriktionsfragmente von Φ X174DNA
HaeIII: A 1353
 B 1078
 C 872
 D 603
 E 310
 F 281
 G 271
 H 234
 I 194
 J 118
 K 72

Ad5-DNA wurde mir von Frau Gudrun Kausel, Φ X174-DNA und λ -DNA von
Herrn Peter Heinrich zur Verfügung gestellt.

Genexpression in vitro

Einsatz von circulären Plasmiden

Zur Erfassung des Genprodukts der klonierten chromosomalen DNA-Fragmente, d. h. letztlich des Proteins, dessen Funktion unmittelbar mit der Rifampicin-Resistenz verbunden ist, wurde die Genexpression in einem geeigneten in vitro-System durchgeführt.

Das gekoppelte Transkriptions/Translations-System, das von Zubay (Zubay, 1973; McCarthy et al., 1985) beschrieben wurde, erlaubt eine zellfreie Synthese von Proteinen an spezifisch zugesetzter DNA. In einem bakteriellen sog. S-30-Extrakt, der nach Abtrennung der Zelldebris noch alle zur Transkription und Translation notwendigen Enzyme und Ribosomen enthält, können durch die Zugabe von Cofaktoren und Substraten und radioaktiver Markierung mit [³⁵S]Methionin Proteinprodukte exprimierter Plasmid-DNA nach elektrophoretischer Trennung auf 15% SDS/PAA-Gelen durch Autoradiographie analysiert werden.

Zweifach über CsCl-Gradienten gereinigte inserthalige Plasmide wurden, wie auf Seite 22 beschrieben, im Zubay-System eingesetzt. Verwendung fand einerseits ein selbst hergestellter S-30-Extrakt und andererseits der von Amersham angebotene kit zur in vitro-Genexpression, wobei die in der vorliegenden Arbeit dargestellten SDS/PAA-Gele unter Verwendung der käuflichen "in vitro-Genexpression kits" erhalten wurden. Als Kontrolle diente das Wildtyp-Plasmid pBR 322, indem ein direkter Vergleich des Proteinmusters der inserthaltigen Plasmide mit dem Wildtyp-Plasmid die Zuordnung von Proteinbanden zum chromosomalen DNA-Fragment und damit zum Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gen ermöglichte. Zugleich diente das in allen Plasmiden enthaltene Ampicillin-Resistenzgen, dessen Produkt, die β -Lactamase (L) mit einer relativen Molmasse von 32 000 bzw. deren prozessierte Form (pL) der Molmasse von 29 000 (v.Doorn et al., 1982) als Indikator für eine gelungene Translation.

Zur Ermittlung optimaler Bedingungen für die Synthese von Proteinen im in vitro-System wurden die Plasmide bei 37°C in unterschiedlicher Konzentration und mit unterschiedlich langer Inkubationsdauer eingesetzt, da sich beide Faktoren auf die Proteinsynthese auswirken können (Amersham-Information; Pratt, 1980; Pratt et al., 1981).

Das bei einer Konzentration von 4 bzw. 10 µg Plasmid-DNA und bei einer Inkubationszeit von 25 bzw. 55 min resultierende Proteinbandenmuster mit drei verschiedenen inserthaltigen Plasmiden 2f, 1u und 1j neben dem Plasmid pBR 322 wurden miteinander verglichen (Fig. 3).

Allgemein läßt sich feststellen, daß die Expression des β -Lactamase-Gens (L bzw. pL) von den unterschiedlichen Versuchsbedingungen weitgehend unbeeinflußt blieb. Auch alle weiteren Proteinbanden des Plasmids pBR 322 (Fig. 3, Bahnen a-d) (eine Zuordnung der Banden erfolgte nicht) traten nahezu mit stets gleicher Intensität auf. Dieses Verhalten der pBR 322-spezifischen Banden fand sich auch bei den inserthaltigen Plasmiden (Fig. 3, Bahnen e-p). Die geringe Intensität aller Banden in Bahn k (Fig. 3, Plasmid 1u, 10 µg DNA, 25 min) scheint auf einem Pipettierfehler zu beruhen.

Ein ganz anderes Bild ergab sich jedoch bei vom Wildtyp-Plasmid abweichenden, fragmentspezifischen Banden der inserthaltigen Plasmide. Die Intensität bzw. das Auftreten der Proteinbanden wurde maßgeblich von der zur Verfügung stehenden DNA-Menge bzw. der Inkubationsdauer bestimmt (Tabelle 17).

Tabelle 17 Intensitätsvergleich von fragmentspezifischen Proteinbanden der Plasmide 2f, 1u und 1j bei Variation der DNA-Konzentration und der Inkubationsdauer bei der in vitro-Genexpression

Protein- bande	Versuchsbedingungen									
	4 µg DNA		25 min		4 µg DNA		55 min		10 µg DNA	
	2f	1u	1j		2f	1u	1j		2f	1u
p 8	-	-	+++		-	-	++		-	-
p10	+++	+++	-		+++	+++	-		+++	++
p45	++	++	-		++	++	-		+	+
p50	-	-	++		-	-	-		+	-
p58	++	++	-		++	+	-		-	+

(+)
vermutlich

Die Bezeichnung der Banden erfolgte im Hinblick ihrer relativen Molmasse (siehe Seite 73) mit p (=Protein) Mrx10⁻³.

Erläuterung: +++ : Bande ist sehr intensiv
 ++ : Bande ist intensiv
 + : Bande noch gut sichtbar, aber bereits verringerte Intensität
 - : Bandenintensität vergleichsweise stark reduziert
 - : Bande fehlt

Das Auftreten der Bande p8, spezifisch für das Plasmid 1j, scheint von zeitabhängigen Faktoren bestimmt zu sein, da die Bande in Inkubationsansätzen von 25 min Dauer sehr intensiv auftritt (Fig. 3, Bahn m und o), bei längerer Inkubation von 55 min (Fig. 3, Bahnen n und p) aber merklich an Intensität verliert.

Von Konzentrations- bzw. kinetischen Faktoren wenig beeinflußbar trat die Bande p10 der Plasmide 1u und 2f in allen Ansätzen mit weitgehend gleichbleibender Intensität auf. Selbst bei der allgemeinen geringen Intensität der Bahn k (Plasmid 1u) ist diese Bande noch deutlich erkennbar.

Begünstigt scheint im Vergleich dazu das Auftreten der Bande p45, ebenfalls bei den Plasmiden 2f und 1u, bei kurzer Inkubationszeit und kleiner DNA-Konzentration (4 µg DNA pro Ansatz) (Fig. 3, Bahnen e und i) zu sein, während ihre Intensität bei hoher DNA-Konzentration (10 µg DNA pro Ansatz) und gleichzeitiger Verlängerung der Inkubationsdauer auf 55 min stark reduziert wird (Fig. 3, Bahn h, 2f, Bahn l, 1u).

Eine noch ausgeprägtere Abhängigkeit von der DNA-Konzentration wurde bei der Bande p58 festgestellt, die bei dem Plasmid 1j fehlt, bei 1u und 2f hingegen auftrat. Bei dem Plasmid 2f findet sie sich nur bei der Konzentration von 4 µg DNA und verschwindet bei der höheren Konzentration von 10 µg DNA pro Ansatz (Fig. 3, Bahnen e und f bzw. g und h). Bei den Ansätzen des Plasmids 1u tritt p58 noch unter allen Versuchsbedingungen auf, verliert aber im Vergleich zu den scheinbar günstigsten Bedingungen mit 4 µg DNA, 25 min Inkubation (Bahn i) deutlich an Intensität (Bahnen j-l).

Eine weitere Besonderheit zeigte noch das Plasmid 1j. Nur bei der Konzentration von 4 µg DNA und 25 minütiger Inkubation wurde eine Bande p50 mit mittlerer Intensität sichtbar (Fig. 3, Bahn m), die sich erstaunlicherweise nochmals bei 2f unter völlig anderen Bedingungen (10 µg DNA, 55 min, Bahnen g und h), wenn auch in geringerem Ausmaß wiederfindet. Bei 1u fehlt diese Proteinbande p50, ungeachtet der gewählten Versuchsbedingungen, vollkommen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß unabhängig vom Plasmid die Bedingungen von 4 µg DNA und 25 minütiger Inkubation die Expression von fragmentspezifischen Genen begünstigen. Diese Versuchsbedingungen wurden gewählt, um die Genexpression aller weiteren inserthaltigen

Plasmide zu analysieren. Es wurden jeweils mehrere Ansätze pro Plasmid durchgeführt, da die Genexpression teilweise von der S-30-Extrakt-Präparation abzuhängen scheint.

Die unter den Bedingungen von 4 µg DNA und 25 minütiger Inkubation bei 37°C erhaltenen Proteinbandenmuster wurden miteinander verglichen (Fig. 4 und 5).

Wie schon aus Fig. 3 deutlich wurde, zeigen die einzelnen inserthaltigen Plasmide in ihren vom Wildtyp-Plasmid pBR 322 abweichenden Proteinbanden keine völlige Übereinstimmung (Tabelle 18).

Tabelle 18 Vergleich des vom Wildtyp-Plasmid pBR 322 abweichenden Proteinbandenmuster der inserthaltigen Plasmide

Protein- bande	Plasmide										
	1u	1b	2f	3d	4d	1j	3b	4g	1m	3t	3y
p 8	-	++++	-	-	-	++++	-	-	-	-	-
p10	++++	-	++++	-	-	-	-	-	-	+	-
p39	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
p45	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
p50	-	-	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
p58	++	+	++	+	+	+	+	++	+	+	+

Die Genexpression wurde mit 4 µg DNA pro Ansatz und 25 minütiger Inkubation bei 37°C durchgeführt.

Erläuterung: ++++ = Bande ist sehr intensiv

+++ = Bande ist intensiv

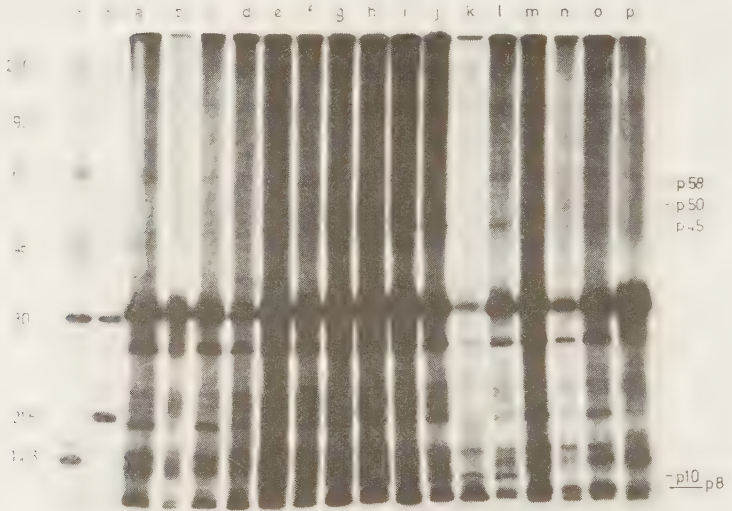
++ = Bande noch gut sichtbar, aber bereits verringerte Intensität

+ = Bandenintensität vergleichsweise stark reduziert

(+) = Bande nur schwach erkennbar, nicht bei jedem Ansatz realisiert

- = Bande fehlt

Fig. 3 In vitro-Genexpression der Plasmide pBR 322, 2f, 1u und 1j in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA-Konzentration pro Ansatz und der Inkubationsdauer



S/S = Proteinstandards

a = pBR 322, 4 µg DNA, 25 min

b = pBR 322, 4 µg DNA, 55 min

c = pBR 322, 10 µg DNA, 25 min

d = pBR 322, 10 µg DNA, 55 min

i = 1u, 4 µg DNA, 25 min

j = 1u, 4 µg DNA, 55 min

k = 1u, 10 µg DNA, 25 min

l = 1u, 10 µg DNA, 55 min

e = 2f, 4 µg DNA, 25 min

f = 2f, 4 µg DNA, 55 min

g = 2f, 10 µg DNA, 25 min

h = 2f, 10 µg DNA, 55 min

m = 1j, 4 µg DNA, 25 min

n = 1j, 4 µg DNA, 55 min

o = 1j, 10 µg DNA, 25 min

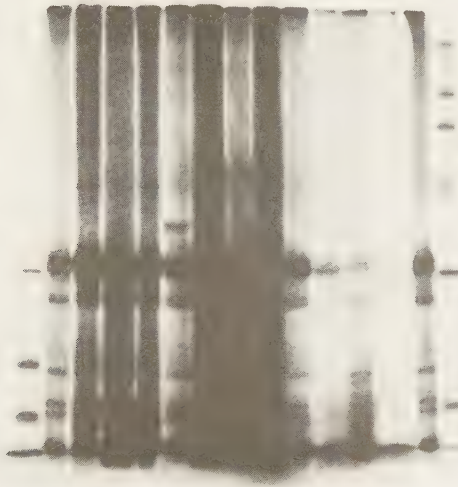
p = 1j, 10 µg DNA, 55 min

Proteinstandards: [^{14}C] methyliert

200 kD	Myosin
92.5 kD	Phosphorylase b
69 kD	Rinderserumalbumin
46 kD	Ovalbumin

30 kD	Carbon.Anhydrase
21.5 kD	Trypsin Inhibitor
14.3 kD	Lysozym
12.5 kD	Cytochrom C

Fig. 4 In vitro-Genexpression der inserthaltigen Plasmide



S/S = Proteinstandards

a = pBR 322

b = 1u

c = 1b

d = 2f

e = 3d

f = 4d

g = 1j

h = 3b

i = 4g

j = 1m

k = 3t

l = 3y

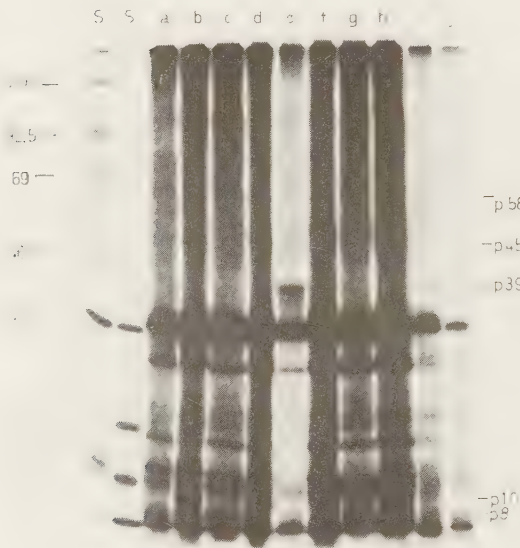
m = pBR 322

Es wurden 4 µg DNA pro Ansatz eingesetzt, die Inkubationsdauer betrug 25 min. Die gelelektrophoretische Analyse erfolgte auf einem 15 % SDS/PAA-Gel.

Proteinstandards: [^{14}C] methyliert

200	kD	Myosin	30	kD	Carbon.Anhydrase
92.5	kD	Phosphorylase b	21.5	kD	Trypsin Inhibitor
69	kD	Rinderserumalbumin	14.3	kD	Lysozym
46	kD	Ovalbumin	12.5	kD	Cytochrom C

Fig. 5 In vitro-Genexpression der inserthaltigen Plasmide



S/S = Proteinstandards

a = pBR 322

b = 1u

c = 1b

d = 2f

e = 3d

f = 4d

g = 1j

h = 3b

i = 4g

j = pBR 322

Pro Ansatz wurden 4 μ g DNA bei 25 minütiger Inkubation verwendet.
Der Ansatz (Fig. 5) unterscheidet sich von dem von Fig. 4 durch Verwendung eines anderen S-30-Extrakts.

Proteinstandards: [14 C] methyliert

200	kD	Myosin	30	kD	Carbon.Anhydrase
92.5	kD	Phosphorylase b	21.5	kD	Trypsin Inhibitor
69	kD	Rinderseumalbumin	14.3	kD	Lysozym
46	kD	Ovalbumin	12.5	kD	Cytochrom C

In ihrem Bandenmuster zeigen die beiden Plasmide 1u und 2f die größte Ähnlichkeit (Fig. 4, Bahn b bzw. d; Fig. 5, Bahn b bzw. d). Die Banden p10, p45 und p58 traten jeweils mit deutlicher Intensität auf, wobei die Bande p10 am intensivsten erscheint, Bande p45 und p58 aber bereits mit schwächerer Intensität. Die Banden p10 und p45 waren für 1u und 2f spezifisch, d. h., in keinem anderen Plasmid waren sie erkennbar. Die Bande p58 hingegen war noch in weiteren Plasmiden realisiert: deutlich erkennbar in 4g (Fig. 5, Bahn i), 3t (Fig. 4, Bahn k) und 3y (Fig. 4, Bahn l), aber weitaus weniger intensiv in 3d und 1m (Fig. 4, Bahnen e und j), und bei 1b, 4d, 1j und 3b (Fig. 4, Bahnen c, f, g und h bzw. Fig. 5, Bahnen c, f, g und h) mit noch geringerer Intensität. Spezifisch für die Plasmide 1b und 1j trat die Bande p8 mit ebenfalls relativ starker Intensität auf (Fig. 5, Bahn c bzw. g). Nur das Plasmid 3d zeigte eine weitere Eigentümlichkeit mit der Bande p39, die eine starke Intensität besaß (Fig. 4/5, jeweils Bahn e). Aus Inkubationsansätzen der Plasmide 2f, 4d, 1j und 3b resultierte eine wenig intensive Bande p50, die jedoch nicht in allen Ansätzen reproduzierbar gefunden werden konnte (2f: Fig. 3, Bahnen g und h; 4d, 1j und 3b: Fig. 4, Bahnen f, g bzw. h). Die einzige, offensichtlich allen inserthaltigen Plasmiden gemeinsame Bande scheint die Bande p58 von mittlerer Intensität zu sein (vgl. Tabelle 18).

Die Charakterisierung der einzelnen Banden erfolgte anhand ihrer Wanderungsstrecke im SDS/PAA-Gel im Vergleich mit Größenmarkern (siehe Legende zu Fig. 3-5), um ihre relativen Molmassen zu bestimmen, woraus sich die Bezeichnung der Proteinbanden abgeleitet hatte (Tabelle 19).

Tabelle 19 Relative Molmassen der Proteinbanden

Bezeichnung der Proteinbanden	Mr
p 8	8 000
p10	10 000
p39	39 000
p45	45 000
p50	50 000
p58	58 000 $\pm$ 5 000

Zur Bestimmung inkorporierter Radioaktivität in Proteinprodukte wurden Whatman GF/A Glass Fibre Filter mit 10 µl des Inkubationsansatzes, wie auf Seite 22 beschrieben, behandelt und im Szintillationszähler ausgewertet. Die Tabelle 20 zeigt typische Werte, deren Größenordnung in analytischen SDS/PAA-Gelen ein deutliches Bandenmuster mit guter Intensität lieferte.

Tabelle 20 Radioaktive Inkorporation in Protein bei der in vitro-Gen-expression

Plasmid	Inkorporierte Radioaktivität [³⁵ S] Methionin IpM
pBR 322	103 273
1u	102 932
1b	204 665
2f	103 265
3d	229 665
4d	154 974
1j	137 874
4g	64 430
3b	163 634
Kontrolle	10 112 626

Bestimmt wurde die Radioaktivität in jeweils 10 µl eines Inkubationsansatzes unter Einsatz von 10-15 µCi (800-1000 Ci/mMol) [³⁵S] Methionin bei einer DNA-Konzentration von 4 µg und 25 minütiger Inkubation. Als Kontrolle dienten 10 µl der Reaktionsmischung ohne zugesetzte DNA.

Der relativ geringe Wert beim Plasmid 4g äußerte sich auch in einer etwas geringeren Intensität der Proteinprodukte.

Einsatz von isolierten Restriktionsfragmenten

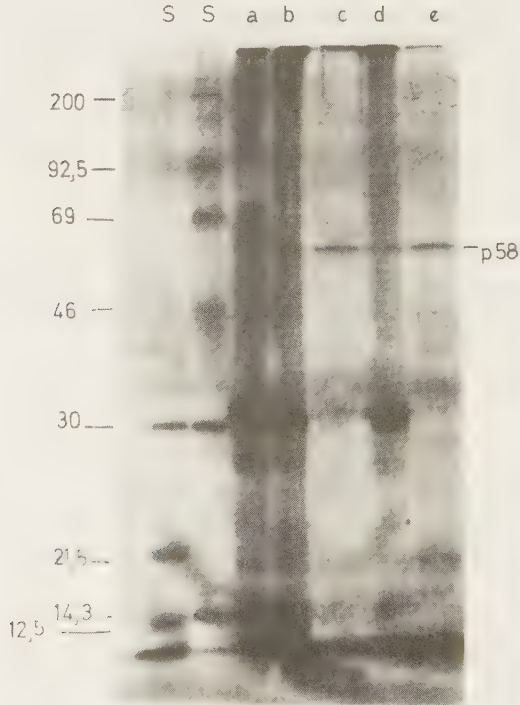
Durch das Einsetzen von Restriktionsfragmenten, sei es ein linearisiertes Plasmid oder ein isoliertes kloniertes DNA-Fragment, lassen sich insertspezifische Genprodukte bei in vitro-Genexpressionsexperimenten eindeutiger zuordnen, indem Vektorproteine eliminiert und eventuelle Fusionsproteine der klonierten DNA mit der Vektor-DNA ausgeschlossen werden können (Pratt et al., 1981).

Die klonierten DNA-Fragmente mit dem untersuchten Gen der Klone 1u und 3d wurden, wie auf Seite 21 beschrieben, isoliert und mit einer Konzentration von 5 µg DNA pro Inkubationsansatz 25 min bei 37°C im Zubay-System eingesetzt. Die Analyse der Genprodukte erfolgte wiederum auf 15% SDS/PAA-Gelen und anschließender Autoradiographie (Fig. 6).

Es zeigte sich, daß beide Fragmente, 1u und 3d, jeweils in Übereinstimmung mit deren Plasmiden (Insert/pBR 322) die Proteinbande p58 besaßen, während alle weiteren bei der Genexpression der vollständigen, circularen Plasmide auftretenden Banden p10 und p45 für 1u (Fig. 4, Bahn b) bzw. p39 für 3d (Fig. 4, Bahn e) hier nun fehlten (Fig. 6, Bahnen c und e).

Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß einerseits die Bande p58 sicher und allein einem dem Fragment zugehörigen Genprodukt entspricht, und andererseits, daß die bei der Inkubation circularer Plasmide zusätzlich auftretenden Banden Fusionsproteine, kodiert vom klonierten Fragment des untersuchten Gens mit der Vektor-DNA, darstellen; die Vermutung, daß es sich bei den Banden p8, p10, p39, p45 und p50 um Proteolyseprodukte des Proteins p58 handeln könnte, scheint somit an Bedeutung zu verlieren.

Fig. 6 In vitro-Genexpression der klonierten, isolierten DNA-Fragmente 1u und 3d



S/S = Proteinstandards

a = pBR 322

b = 1u, circuläres Plasmid

c = 1u, isoliertes chrom. Frag.

d = 3d, circuläres Plasmid

e = 3d, isoliertes chrom. Frag.

Der Ansatz wurde mit 5 µg DNA und 25 minütiger Inkubation durchgeführt.

Proteinstandards: [^{14}C] methyliert

200	kD	Myosin	30	kD	Carbon.Anhydrase
92,5	kD	Phosphorylase b	21,5	kD	Trypsin Inhibitor
69	kD	Rinderseumalbumin	14,3	kD	Lysozym
46	kD	Ovalbumin	12,5	kD	Cytochrom C

Inaktivierung des klonierten DNA-Fragments durch Insertion

Ähnlich der Mutagenese mit dem Phagen Mu sollte sich eine Inaktivierung des Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gens durch die Insertion eines anderen hinreichend großen DNA-Fragments erreichen lassen. Die erhaltenen Stämme sollten dann die Rifampicin-Empfindlichkeit des Wildtyps besitzen. Bei der Analyse des Proteinprodukts beim in vitro-Genexpressionsexperiment sollte sich durch den Vergleich zu den Ausgangsplasmiden der Rifampicin-resistenten Klone eindeutig ermitteln lassen, welche Proteinbanden dem funktionellen Genprodukt zuzuordnen sind.

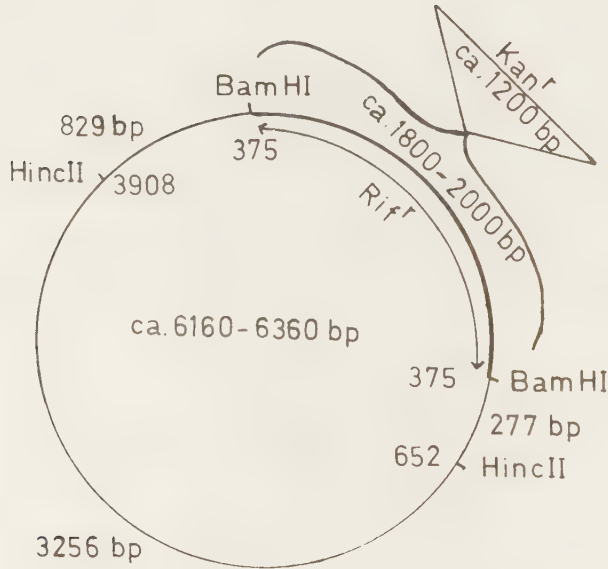
Durch die Restriktion mit HincII der Plasmide pBR 322, welches selbst zwei Schnittstellen für HincII besitzt, 1u, 2f und 3d entstehen folgende Fragmente (vgl. Fig.7 und Fig. 8):

pBR 322:	3256 bp, 1106 bp;	Fig. 8, Bahn o
1u	: 3256 bp, ca. 2400 bp, ca. 500 bp;	Fig. 8, Bahn c
2f	: 3256 bp, ca. 1700 bp, ca. 800 bp, ca. 400 bp;	Fig. 8, Bahn g
3d	: 3256 bp, ca. 1600 bp, ca. 1500 bp;	Fig. 8, Bahn k

Die jeweils kleinsten Fragmente sind infolge geringer Konzentration auf dem Gel nicht erkennbar, während zusätzliche Banden aufgrund unvollständigen Abbaus durch das Restriktionsenzym bzw. unterschiedliche Konformationen der ungeschnittenen Plasmide zustande kommen (Fig. 8). Bei allen klonierten Fragmenten ergibt sich jedoch mindestens eine HincII-Schnittstelle, die sich für eine Insertierung des Kan^r-Gens eignet.

Das Plasmid pUC-4K, dessen Vorzug eine von einer Vielzahl von Restriktionsstellen eingerahmte Kanamycin-Resistenz (ca. 1200 bp) ist (Vieira and Messing, 1981), wurde durch Hydrolyse mit EcoRI und HincII geschnitten, so daß das Kanamycin-Resistenzgen als ein von HincII-Schnittstellen begrenztes Fragment vorlag (Fig. 8, Bahn a). Durch den zusätzlichen Abbau mit EcoRI, das außerhalb der HincII-Restriktionsstellen schneidet, gelingt es, eine Recircularisierung des pUC-4K-Plasmids nahezu auszuschließen.

Fig. 7 Schematische Darstellung des Vektors pBR 322 mit kloniertem DNA-Fragment



Restriktionsfragmente von pBR 322 bzw. pBR 322/Insert (in bp):

	pBR 322	1u	2f	3d *
HincII	3256	3256	3256	3256
	1106	ca. 2400	ca. 1700	ca. 1600
		ca. 500	ca. 800	ca. 1500
			ca. 400	

* Bei 3d tritt eine weitere Restriktionsbande mit ca. 1100 bp auf, deren Ursache nicht geklärt werden konnte. Das isolierte 3d-Fragment weist bei einem Abbau mit HincII 2 Banden der Länge von ca. 800 bp und 1200 bp auf (ohne Beleg).

Das zweifach geschnittene (EcoRI, HincII) Plasmid pUC-4K wurde mit den durch HincII partiell geschnittenen, d. h. nur unvollständig durch die Restriktionsendonuklease abgebauten Plasmide 1u, 2f und 3d ligiert, in DH1 transformiert und die Transformanten auf Kanamycin (20 µg/ml) und Ampicillin (20 µg/ml) enthaltenen YT-Platten selektioniert. Von jedem Ausgangsplasmid wurde ein Klon durch mehrfaches Ausstreichen gereinigt und dessen Rifampicin-Sensitivität überprüft (Tabelle 21). Alle isolierten Klone zeigten eine dem Wildtyp DH1 entsprechende Rifampicin-Sensitivität.

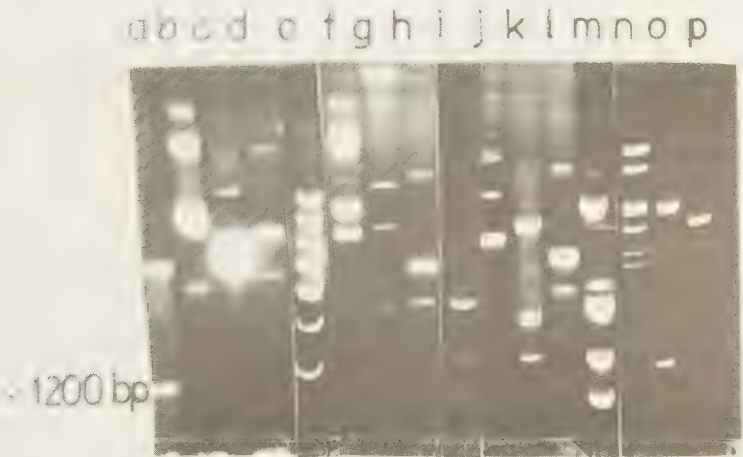
Tabelle 21 Rifampicin-Sensitivität von Klonen, die Plasmide enthalten, deren Rifampicin-Resistenz vermittelndes Gen durch die Insertion des Kan^r-Gens inaktiviert worden war. Zum Vergleich ist die Rifampicin-Empfindlichkeit der Klone und ihrer Ausgangsplasmide 1u, 2f und 3d angegeben.

Bakterienstamm	Minimale Hemmkonzentration [µg /ml] Rifampicin		Resistenzfaktor	
	M9	YT	M9	YT
DH1/pBR 322	10	10	1	1
DH1/1u	> 250	> 250	> 25	> 25
DH1/1u kan	10	10	1	1
DH1/2f	250	> 250	25	> 25
DH1/2f kan	10	10	1	1
DH1/3d	250	> 250	25	> 25
DH1/3d kan	10	10	1	1

Eine Restriktionsanalyse der mutagenisierten Plasmide im Vergleich zu den Ausgangsplasmiden zeigte in allen drei Plasmiden 1u kan, 2f kan, 3d kan von den Plasmiden 1u, 2f und 3d abweichende Restriktionsmuster (Fig. 8). Bei allen Plasmiden, die das Kan^r-Gen mit der Länge von ca. 1200 bp enthalten, trat bei dem Abbau mit HincII eine entsprechende Bande auf [Fig. 8, Bahn e (1u kan), Bahn i (2f kan), Bahn m (3d Kan)]. Leider konnten die Plasmide auch nach verlängerter Inkubation nicht vollständig geschnitten werden. Die bei ca. 800 bp auftretende Bande, die bei fortgesetztem Abbau der mutagenisierten Plasmide (ab ca. 3 h) auftritt, läßt sich nicht zuordnen.

Ergänzend wurde noch anhand eines weiteren Restriktionsmusters von mit BamHI/HindIII geschnittenen Ausgangsplasmiden bzw. den mutagenisierten Plasmiden überprüft, ob sich die Restriktionsmuster der jeweiligen Plasmide voneinander unterscheiden (Fig. 9). Die mutagenisierten, Kan^r-Gen enthaltenden Plasmide zeigen ein von den Ausgangsplasmiden abweichendes Bandenmuster. Eine genaue Zuordnung der Banden erfolgte nicht.

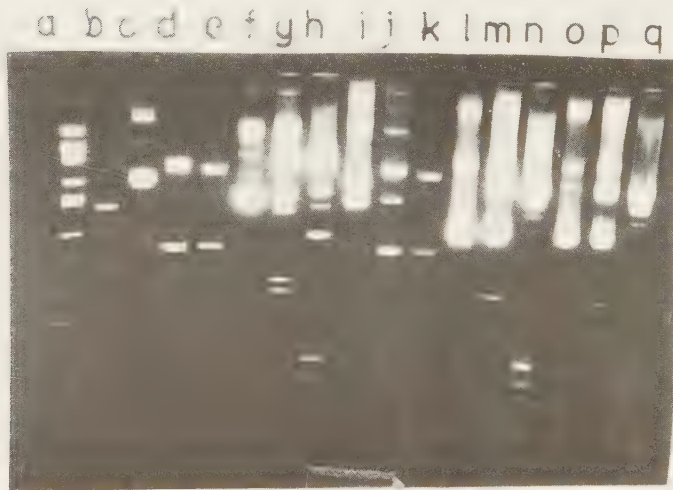
Fig. 8 Restriktionsanalyse (HincII) der durch Insertion des Kana-
mycin-Resistenzgens inaktivierten Plasmide 1u kan, 2f
kan, 3d kan im Vergleich zu deren Ausgangsplasmiden 1u,
2f und 3d



a=pUC-4K (ca.2700bp, ca. 1200bp); b=1u (ungeschnitten, ca.6100bp); c=1u/HincII (ca.500bp nicht sichtbar, ca.2400bp und 3256bp, kaum getrennt); d=1u kan (ungeschnitten, ca. 7300bp); e=1u kan/HincII (ca. 800bp, unbekannt, 1200bp, Kan^r Gen, 1500bp, unbekannt, 1800 bp, unbekannt, 2400bp, 1u/HincII Fragment, 3256bp, pBR322/HincII Fragment, vgl. Fig. 7), obere Banden unbekannt); f=2f (ungeschnitten, ca.6100bp); g=2f/HincII (kleinste Banden mit ca.400 und ca.800bp nicht sichtbar, ca.1700bp, Fragment aus 2f und pBR322 Anteil, 3256bp, pBR322/HincII Fragment, oberste Bande unbekannt); h=2f kan (ungeschnitten, ca. 7300bp); i=2f kan/HincII (ca.800bp, unbekannt, 1200bp, Kan^r Gen, 1700bp (Fragment aus 2f und pBR322 Anteil, 3256bp, nur sehr schwach, pBR322/HincII Fragment); j=3d (ungeschnitten, ca. 6300bp); k=3d/HincII (ca. 1100bp, unbekannt, 1600 und 1500bp, Fragmente aus 3d und pBR322 Anteil, 3256bp, pBR322/HincII Fragment); l=3d kan (ungeschnitten, ca. 7500bp); m=3d kan/HincII (800bp, unbekannt, 1200bp (Kan^r Gen), 1500 und 1600 bp, nicht getrennt, 1800bp, unbekannt, 3256bp, pBR322/HincII Fragment); n=Ad2 DNA/HindIII (1044, 1332, 2088, 2556, 2736, 2844, 3204, 3276, 3276, 5220, 8172bp); o=pBR322/HincII (1106bp und 3256bp); p=pBR322 (ungeschnitten, 4363bp).

Die Gelelektrophorese ist nach rechts oben leicht verzogen.
Die Betrachtung der Banden erfolgte von der jeweils untersten sicht-
baren Bande aufwärts. Die Vielzahl der Banden ist wohl einerseits auf
unvollständigen Abbau der einzelnen Plasmide und andererseits auf un-
terschiedliche Konformationen der ungeschnittenen Plasmide zurückzu-
führen.

Fig. 9 Restriktionsanalyse (BamHI/HindIII) der durch Insertion des Kanamycin-Resistenzgens inaktivierten Plasmide 1u kan, 2f kan, 3d kan im Vergleich zu deren Ausgangsplasmiden 1u, 2f und 3d



- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| a = Ad5 DNA/HindIII | j = 2f/BamHI |
| b = pUC-4K/HincII * | k = 2f/BamHI/HindIII |
| c = 1u | l = 2f kan |
| d = 1u/BamHI | m = 2f kan/BamHI |
| e = 1u/BamHI/HindIII | n = 2f kan/BamHI/HindIII |
| f = 1u kan | o = 3d kan |
| g = 1u Kan/BamHI | p = 3d kan/BamHI |
| h = 1u kan/BamHI/HindIII | q = 3d kan/BamHI/HindIII |
| i = 2f | |

Restriktionsfragmente von Ad5-DNA: (in bp) (Ad5-DNA wurde mir von
HindIII: A 8172 F 2880 Frau Gudrun Kausel zur
B 6012 G 2844 Verfügung gestellt).
C 5220 H 2088
D 4608 I 1044
E 3276

* Aus bisher nicht geklärten Gründen ist das Kan^r mit einer Länge von ca. 1200 bp auf dem Gel nicht sichtbar. Die auftretende Bande (pUC) kann aber als Größermarker für ca. 2700 bp dienen.

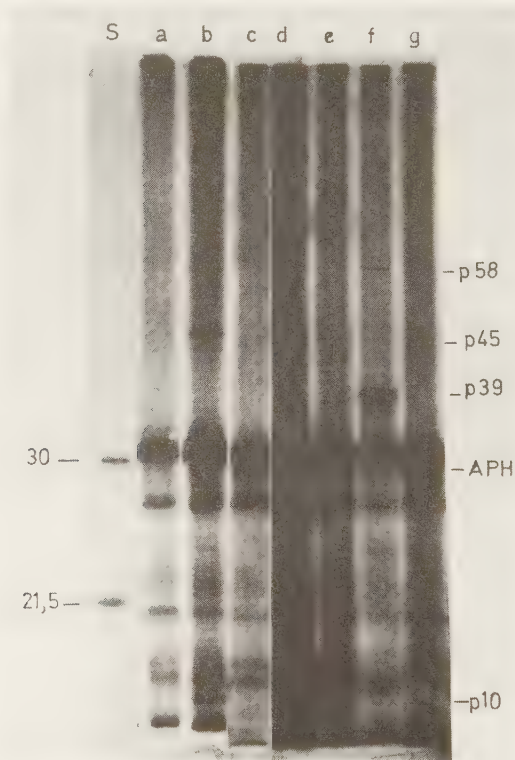
Die mutagenisierten Plasmide 1u kan, 2f kan und 3d kan wurden im in vitro-Expressionsexperiment durch nachfolgende Analyse der Genprodukte auf 15% SDS/PAA-Gelen mit deren Ausgangsplasmiden verglichen (Fig. 10).

Die Unterschiede der Plasmide 1u, 2f und 3d in den Banden p10, p45 und p58 bei 1u und 2f bzw. p39 und p58 des Plasmids 3d im Vergleich zum Wildtyp-Plasmid pBR 322 waren verschwunden, während die β -Lactamase und die anderen pBR-322-spezifischen Proteinbanden weiterhin exprimiert wurden. Eine zusätzliche Bande mit einer relativen Molmasse von ca. 9000 trat bei allen mutagenisierten Plasmiden auf, deren Intensität allerdings nur sehr gering war. Dieses Protein könnte dem Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gen zugeordnet werden, weil dessen Translation infolge der Insertion des Kanamycin-Resistenzgens vorzeitig abbricht.

Zugleich konnte bei den mutagenisierten Plasmiden, die das Kanamycin-Resistenzgen des Transposons Tn903 enthielten, die diesem Gen zugehörige Proteinbande der relativen Molmasse von 27 000 (Aminoglycosidphosphotransferase = APH) (Fuhrmann and Hennecke, 1982; Meagher et al., 1977) gefunden werden.

Dieser Befund kann als Hinweis gedeutet werden, daß die Banden p10, p45 und p58 der Plasmide 1u und 2f bzw. p39 und p58 des Plasmids 3d zu Proteinen des Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gens gehören bzw. teilweise Fusionsprodukte der Vektor-DNA mit der klonierten DNA darstellen können.

Fig. 10 In vitro-Genexpression der durch Insertion des Kan^r-Gens inaktivierten Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gene der Plasmide 1u, 2f und 3d im Vergleich zu deren Ausgangsplasmiden



S = Proteinstandard

a = pBR 322

b = 1u

c = 1u kan

d = 2f

e = 2f kan

f = 3d

g = 3d kan

Pro Ansatz wurden 4 µg DNA bei 25 minütiger Inkubation eingesetzt.

Die Analyse erfolgte auf einem 15% SDS/PAA-Gel.

Proteinstandard: [¹⁴C] methyliert

30 kD Carbon.Anhydrase; 21.5 kD Trypsin Inhibitor

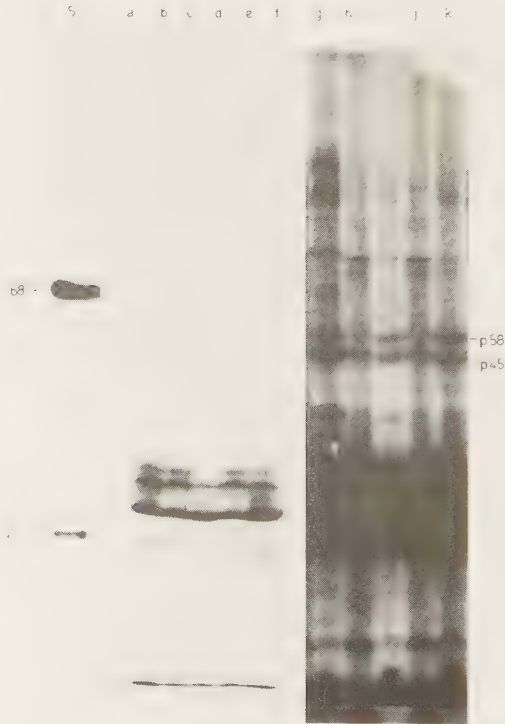
Genexpression in vivo

Nachdem die Verhältnisse bei in vitro-Experimenten nicht zwingend auch für die tatsächlich in vivo ablaufenden Vorgänge gelten, war es für mich von Interesse, die Gegebenheiten der Proteinexpression des Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gens in dem in vivo-System der Minizellen zu analysieren.

Einige mutierte E. coli-Bakterienstämme besitzen die Besonderheit, während des normalen Wachstums durch aberrante Zellteilung Minizellen, die keine DNA besitzen und nicht teilungsfähig sind, zu bilden (Adler et al., 1967; Roozen et al., 1971). Enthält aber der Bakterienstamm R-Faktoren, Episome oder Plasmide, so segregieren diese mit einer gewissen Menge an RNA-Polymerase in die Minizellen, worauf diese in ausreichendem Maße zur RNA-Synthese und nachfolgender Proteinsynthese befähigt sind. Hierbei erfolgt die Transkription/Translation, von evtl. in Minizellen enthaltener stabiler mRNA abgesehen, spezifisch für die extrachromosomale DNA (Meagher et al., 1977; Crooks et al., 1983; Walker and Gaastra, 1983). Bei Abtrennung der plasmidhaltigen Minizellen von Parentalzellen durch mehrmalige Dichtegradientenzentrifugation lassen sich die Genprodukte des Plasmids durch Inkubation der Minizellen in einem geeigneten radioaktiven Inkorporationsmedium und anschließender elektrophoretischer Analyse ermitteln.

Alle inserthaltigen Plasmide 1u, 1b, 2f, 3d, 4d, 1m, 1j, 3b, 3t, 3y und 4g und als Kontrolle das Wildtyp-Plasmid pBR 322 wurden in den Minizell-produzierenden Stamm DS410 transformiert (Methodenteil Seite 21) und bezüglich ihrer Resistenzeigenschaften und teilweise ihrer RNA-Polymerase-Hemmbarkeit durch Rifampicin (Tabellen 14 und 15) getestet. Die Isolierung der Minizellen erfolgte wie auf Seite 23 beschrieben. Die so gewonnenen plasmidhaltigen Minizellen wurden in geeigneten Verdünnungen in Methionin-Assay-Medium (Steele et al., 1949) suspendiert und in Gegenwart von [^{35}S] Methionin inkubiert (Methodenteil Seite 23). Die Analyse der synthetisierten Genprodukte erfolgte auf 11% SDS/PAA-Gelen mit anschließender Autoradiographie (Methodenteil Seite 18) (Fig. 11).

Fig. 11 In vivo-Genexpression der plasmidhaltigen Minizellen bei Variation der Inkubationsdauer



S = Proteinstandard

a = DS410/ohne Plasmid
b = DS410/pBR 322
c = DS410/1u
d = DS410/1b
e = DS410/2f
f = DS410 3d

je 3 h In-
kubation
37°C

g = DS410/1u
h = DS410/1b
i = DS410/2f
j = DS410/3d
k = DS410/3t

je 15 h In-
kubation
28°C

Die Analyse erfolgte auf einem 11% SDS/PAA-Gel.

Proteinstandard:

68 kD Rinderserumalbumin; 25.7 kD Chymotrypsinogen A.

Erstaunlicherweise zeigten nur drei der Plasmide (1u, 2f und 3t) signifikante Unterschiede im Vergleich mit den pBR 322-haltigen Minizellen. Die Banden p45 und p58 der in vitro-Experimente konnten in den Minizellen, die die Plasmide 1u, 2f bzw. 3t enthielten, entdeckt werden (Fig. 11, Bahnen c und e bzw. g, i und k). Die Bande p10 konnte aufgrund des schlechten Auflösungsvermögens des Gels nicht sicher zugeordnet werden.

Interessanterweise besaßen auch hier im in vivo-Experiment die beiden Stämme mit 1u- und 2f-Plasmiden die Banden p45 und p58 mit starker Intensität. Beim Auftreten dieser Banden erwies es sich als unbedeutend, welchen Zeitraum die Inkubation umfaßte (3 bzw. 15 h), da die Banden in ihrer Konzentration relativ unbeeinflußt blieben und sich damit als stabile, von proteolytischen Abbauprozessen nicht betroffene Proteinbanden erwiesen (Fig. 11, Bahnen c und e bzw. g und i). Die Vielzahl von Banden, die nach 15-stündiger Inkubation auftraten, ist wohl hauptsächlich auf unspezifische Expression z. T. von stabiler mRNA in den Minizellen zurückzuführen.

Darüber hinaus wurden Versuche unternommen, durch Minizellisolierung aus Rifampicin-haltigem Wachstumsmedium (30 µg/ml) bzw. Genexpression der Minizellen in Rifampicin-Gegenwart (30 µg/ml), d. h. Rifampicin-haltiges Inkorporationsmedium, eine Induzierbarkeit der Genprodukte zu bestimmen. Die Inkubationsdauer betrug bei 28°C 15 Stunden.

Es zeigte sich eine gewisse Intensivierung aller Proteinbanden, d. h. außer p45 und p58 auch die dem Plasmid pBR 322 spezifischen Banden, was auf einen unspezifischen Effekt des Antibiotikums schließen läßt (ohne Beleg).

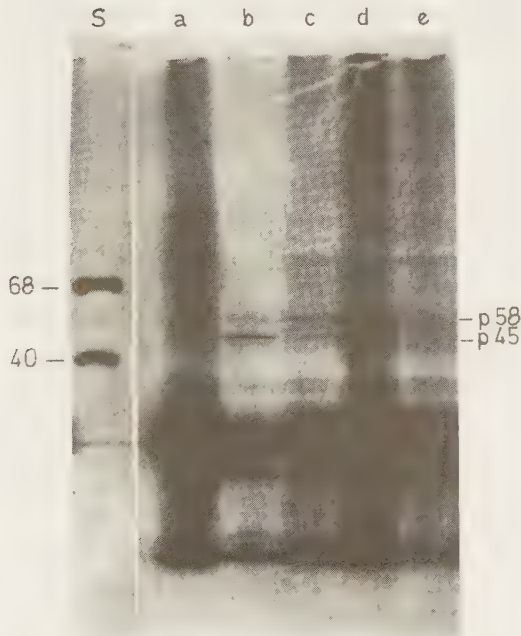
Durch diesen in vivo-Versuch, wobei die in lebenden Zellen tatsächlich ablaufenden Vorgänge im Gegensatz zum in vitro-System am besten simuliert werden können, läßt sich somit keine verstärkte Exprimierbarkeit der Genprodukte p45 bzw. p58 der chromosomalen DNA-Fragmente durch die Rifampicin-Gegenwart im Nährmedium bzw. im Inkorporationsmedium erzielen, wie es sich z. B. für ein auf R-Faktoren kodierendes Tetracyclin-Resistenz vermittelndes Protein zeigen läßt, dessen Synthese durch die Zugabe von Tetracyclin während des Wachstums oder der Inkubation bei der in vivo-Expression beträchtlich stimuliert werden kann (Levy and McMurry, 1974; Frazer and Curtiss III, 1975).

Ein weiterer Effekt, der sich in einem in vivo-System überprüfen läßt, ist das Auftreten von Proteinvorläufern, deren N-terminale Signalsequenz infolge unvollständigen Prozessierens in Minizellen nicht abgespalten wird. Die Prozessierung der für sekretorische oder in Membranen inkorporierte Proteine charakteristischen Signalsequenz (Davis and Tai, 1980) kann durch die Zugabe von Ethanol während der Inkubation der Minizellen nahezu inhibiert werden (Palva et al., 1981; Walker and Gastra, 1983).

Der Zusatz von 8.3% Ethanol, bezogen auf die Gesamtmenge des Inkubationsansatzes bei der radioaktiven Markierung der Expression plasmidkodierter Proteine der Plasmide 1u und 2f, resultierte in einer deutlichen Abschwächung beider Banden, p45 und p58 (Fig. 12, Bahnen c und e). Die β -Lactamase zeigte erwartungsgemäß bei Gegenwart von Ethanol etwas verstärkte Mengen der unprozessierten Form (Mr 32 000). Eine von p45 und p58 abweichende Bande mit jeweils höherer Molmasse, die einer unprozessierten Form des Genprodukts entsprechen könnte, wurde bei keinem der Klone beobachtet, womit ich allerdings die Möglichkeit einer Signalsequenz nicht ausschließen möchte. Die Abschwächung der Banden p45 und p58 (Fig. 12, Bahnen c und e) ist wohl am wahrscheinlichsten auf eine allgemeine Störung des vor allem auf die Membranpotentiale wirkenden Ethanols zurückzuführen, was damit auch als Hinweis gedeutet werden kann, daß es sich bei den Proteinen p45 und p58 tatsächlich um Membranproteine handelt.

Die Möglichkeit, das Protein p58 als Vorläufer von p45 einzustufen, halte ich für völlig ausgeschlossen, da Signalsequenzen im Durchschnitt eine Länge von ca. 20 Aminosäuren, was etwa einer relativen Molmasse von 3 000 entspricht, besitzen (Davis and Tai, 1980) und somit eine Diskrepanz der Molmasse von 13 000 (p45-p58) nicht verursachen können.

Fig. 12 In vivo-Genexpression der plasmidhaltigen Minizellen unter Zusatz von Ethanol im Inkubationsansatz



S = Proteinstandard

a = DS410/pBR 322

b = DS410/lu

c = DS410/lu + 8.3% Ethanol

d = DS410/2f

e = DS410/2f + 8.3% Ethanol

Der Inkubationsansatz (3 h, 37°C) enthielt 8.3% Ethanol, zugegeben bei Beginn der Inkubation.

Proteinstandard: 68 kD Rinderserumalbumin; 40 kD Aldolase.

Diskussion

Das Verhalten der E. coli-Bakterienzelle gegenüber Antibiotika ist für die Ermittlung von Resistenzursachen von großem Interesse.

Für die Ausbildung der Resistenz gegenüber Rifampicin können bisher grundsätzlich drei Klassen von Mutanten unterschieden werden. Neben den erst seit relativ kurzer Zeit bekannten sog. rid-(rif dependent) Mutanten, die in ihrem Wachstum auf die Gegenwart von Rifampicin angewiesen sind (Dabbs and Looman, 1981), bildet die Klasse der RNA-Polymerase-(rpoB) Mutanten das zentrale Objekt der Rifampicin-Forschung. Die Resistenzursache konnte in allen Fällen dieser Rifampicin-resistenten Mutanten mit einer mutierten β -Untereinheit der DNA abhängigen RNA-Polymerase begründet werden (Wehrli et al., 1968; diMauro et al., 1969; Heil and Zillig, 1970).

RNA-Polymerase-Mutanten lassen sich mit einer Häufigkeit von 10^{-8} bis 10^{-9} (Riva and Silvestri, 1972; Koch, 1981) durch Ausstreichen auf Rifampicin-haltigem Medium (100 $\mu\text{g/ml}$) leicht isolieren (Kollenda, 1981). Im allgemeinen zeigen diese Mutanten in vivo hohe Resistenzfaktoren - für ihre Charakterisierung aber weitaus bedeutender: es läßt sich bei diesen Mutanten im in vitro-Aktivitätstest der RNA-Polymerase ein Rifampicin-resistentes Enzym nachweisen.

Durch Untersuchungen an merodiploiden E. coli-Stämmen konnte gezeigt werden, daß die Mutation zur Rifampicin-Resistenz der RNA-Polymerase überwiegend rezessiv auftritt (Riva and Silvestri, 1972; Ovchinnikov et al., 1983; Petrenik et al., 1984).

Die Isolierung und Charakterisierung einer Vielzahl von Rifampicin-resistenten E. coli-Mutanten wird in der Arbeit von Mindlin et al. (1972) beschrieben. Die Mutanten, die sich in ihren minimalen Hemmkonzentrationen beträchtlich unterscheiden, zeigen darüber hinaus auch Unterschiede im Hemmverhalten der RNA-Polymerase. Mutanten mit relativ schwach ausgeprägter in vivo-Rifampicin-Resistenz (minimale Hemmkonzentration von $\leq 50 \mu\text{g/ml}$ in Vollmedium) besitzen eine in vitro-sensitive-RNA Polymerase, während hochresistente Bakterienstämme (minimale Hemmkonzentration um $100 \mu\text{g/ml}$ in Vollmedium) eine durch Rifampicin nicht zu hemmende RNA-Polymerase aufweisen. Die genetische Kartierung ergab jedoch, daß in allen Fällen, sowohl bei den hoch- als auch bei den niedrig-resistenten Stämmen, der Genort der RNA-Poly-

merase bei 90 min mutiert war; d. h., es konnten keine Rifampicin-resistenten Bakterien gefunden werden, die außerhalb dieses Genorts kartierten (Mindlin et al., 1972).

Dieses Phänomen, dessen Erklärung allerdings noch aussteht, veranlaßte Mindlin et al. zu der Schlußfolgerung, die mögliche Existenz von Rifampicin-resistenten Mutanten, deren Resistenz sich ohne Beteiligung der RNA-Polymerase - evtl. durch die Mutation einer anderen Zellkomponente - ausbildet, auszuschließen.

In krassem Gegensatz zu dieser Vorstellung konnte erstmals Tropschug (1980) durch Nitrosoguanidin behandelte Bakterienzellen stabile E. coli-Mutanten isolieren, deren RNA-Polymerase in vitro unverändert sensitiv gegenüber Rifampicin reagiert, d. h. den Rifampicin-Enzym-Komplex bildet, aber in vivo eine beträchtlich über dem Wildtyp liegende Rifampicin-Resistenz aufweisen (minimale Hemmkonzentrationen zwischen 65 und 200 µg/ml in Vollmedium; Tabelle 2).

Auch durch eine Transduktion des Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gens oben genannter Mutanten in einen sensitiven Rezipientenstamm lassen sich Rifampicin-resistente Mutanten isolieren, deren Phänotyp mit dem der ursprünglich isolierten Mutanten übereinstimmt, bzw. sie zeigen eine hier sogar noch etwas verstärkt ausgeprägte in vivo-Rifampicin-Resistenz bei zugleich in vitro-sensitiver RNA-Polymerase (Tabellen 2 und 3).

Dieses für eine Transduktion mit dem Bakteriophagen Pl_{kc} zugängliche mutierte Gen muß somit einen definierten Genabschnitt ≤ 2 min (ca. 90 000 bp) des E. coli-Chromosoms umfassen, dessen Genprodukt - durch ein Mutationseignis verändert - die Bakterienzelle zur Resistenz gegenüber Rifampicin befähigt.

In den Transduktanten scheint sich bei diploidem Gensatz $\text{rif}^{\text{R}}/\text{rif}^{\text{S}}$ die Rifampicin-Resistenz zu manifestieren, d. h., das rif^{R} -Gen verhält sich offensichtlich dominant. Dieses Ergebnis ist von besonderem Interesse, da die Rifampicin-Resistenz in merodiploiden Stämmen, die von einer Mutation der β -Untereinheit der RNA-Polymerase herrührt, je nach Art der Mutation zum Teil dominant, mit höherer Frequenz aber rezessiv auftritt (Riva and Silvestri, 1972; Ovchinnikov et al., 1983; Petrenik et al., 1984).

Das vermehrte Auftreten von rezessiven RNA-Polymerase-Mutationen mag darin begründet sein, daß eine intakte Wildtyp-RNA-Polymerase für die Bakterienzelle von entscheidender Bedeutung ist; d. h., die Mutation zur Rifampicin-Resistenz kann durchaus die korrekte Funktion des Enzyms beeinträchtigen, wie es z. B. das Auffinden von E. coli-Mutanten, deren Arginin-Biosynthese aufgrund einer Rifampicin-Resistenz der RNA-Polymerase verändert ist, bestätigt (Wozny et al., 1975).

Diejenige Zellkomponente hingegen, deren Mutation eine vom *rpoB*-Gen unabhängige Rifampicin-Resistenz zur Folge hat, scheint somit für die Zelle eine weniger essentielle Rolle zu spielen, bzw. das Genprodukt des Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gens bleibt durch die Mutation in seiner Funktion unbehindert, d. h., für das Bakterium entstehen durch die Mutation keine wesentlichen funktionellen Nachteile.

Vollkommen unabhängig von diesen Mutanten und Transduktanten konnten durch die Insertion des Bakteriophagen Mu E. coli-Mutanten mit einer Häufigkeit von ca. 2×10^{-7} isoliert werden (Tabelle 4), die sich in ihren minimalen Hemmkonzentrationen für Rifampicin deutlich vom Wildtyp HfrH unterscheiden (Tabelle 5), während die RNA-Polymerase ein dem Wildtyp vergleichbares Hemmverhalten zeigte (Tabelle 6).

Ausgehend von der Mutante 5/3 und der Transduktanten 10/1 t, wurde durch Shotgun-Klonierung und Selektion auf Rifampicin-haltigem Medium (50 µg/ml) das Rifampicin-Resistenz vermittelnde Gen kloniert. Alle Klone besaßen die spezifischen Eigenschaften einer in vivo deutlich ausgeprägten Rifampicin-Resistenz (minimale Hemmkonzentrationen um 250 µg/ml) bei gleichzeitig unverändert Rifampicin-sensitiver RNA-Polymerase (Tabellen 14 und 15).

Diese Befunde legen die Vermutung nahe, daß es sich bei allen, wenn gleich auf völlig unterschiedliche Weise gewonnenen Mutanten stets um das gleiche Gen handelt, dessen Mutation zu einer von *rpoB*-Mutationen unabhängigen Rifampicin-Resistenz führt.

Die von Rifampicin-Gegenwart unabhängige Expression dieses mutierten Gens - und damit unterscheidet sich dieses deutlich von dem der *rid*-Mutanten - vermittelt der Bakterienzelle die Fähigkeit, in Rifampicin-haltigen Medien zu wachsen, wobei die Mutation nicht einen Alles-oder-

Nichts-Phänotyp bewirkt, sondern beträchtliche Variationen des Resistenzgrades verursacht. Während die Unterschiede der Resistenzfaktoren bei den ursprünglich isolierten Mutanten 5/3, 7/3, 9/1, 10/1, 10/2 und 110 noch durch Sekundärmutationen erklärt werden können, zeigen bei deren Eliminierung die Transduktanten daraufhin die erwartete Erhöhung der minimalen Hemmkonzentrationen, die jedoch nicht beliebig gesteigert werden können (Tabelle 2).

Das bei den Mu-lysogenen Mutanten besonders auffällige verschiedene Ausmaß der Resistenz scheint durch die unterschiedliche Auswirkung des Insertionsortes von Mu begründet zu sein, wodurch offensichtlich die Funktion des Resistenz-auslösenden Genprodukts entscheidend mitbeeinflusst wird.

Die variable Ausprägung der Rifampicin-Resistenz läßt sich auch bei RNA-Polymerase-Mutanten beobachten (Mindlin et al., 1972; Wehrli, 1977; Ovchinnikov et al., 1983; Petrenik et al., 1984), wobei unterschiedliche Mutationen des *rpoB*-Gens unterschiedliche Abstufungen der Rifampicin-Resistenz bewirken, die sich auch in einer unterschiedlichen Stabilität des Enzym-Antibiotikum-Komplexes, d. h., in einer Variation der Bindungsstärken, äußern (Wehrli, 1977). Mit einer ähnlichen Überlegung ließe sich auch die unterschiedliche Resistenz der Mutanten und Transduktanten erklären, da durch verschieden mögliche Mutationen die Wechselwirkung von Rifampicin mit dem Genprodukt des Resistenz vermittelnden Gens, z. B. einem Protein, durch unterschiedlich starke Bindung, evtl. aufgrund von Konformationsänderungen des Proteins, die Effektivität der Resistenzausprägung beeinflusst wird.

Mit dieser Hypothese läßt sich auch die vermutlich durch den Gen-Dosis-Effekt verursachte Resistenzsteigerung der Klone (Tabelle 14) erklären, wobei die vermehrte Synthese des Proteins die Zelle zur Toleranz von höheren Rifampicin-Konzentrationen veranlaßt.

Die bei allen Mutanten und Transduktanten auffälligen Unterschiede der minimalen Hemmkonzentrationen in M9- und YT-Medium ist ebenfalls ein für RNA-Polymerase-Mutanten beschriebener Effekt (Mindlin et al., 1972). Die dafür angebotene Erklärung (Mindlin et al., 1972), daß die RNA-Polymerase durch eine geringfügige Hemmung durch Rifampicin nicht ausreichend mRNA zu synthetisieren vermag, um das Wachstum auf Minimalmedium aufrechtzuerhalten, so daß sich Unterschiede im Hemmverhalten der RNA-Polymerase bei sensitiveren Enzymen besonders auf Minimal-

medium bemerkbar machen, ließe sich auch für die hier beschriebenen Mutanten anwenden, da die Möglichkeit besteht, daß eine kleine Menge an Rifampicin in die Zelle gelangt und die RNA-Polymerase geringfügig hemmen kann, wobei die unmutierte RNA-Polymerase für den Angriff des Rifampicins wesentlich anfälliger sein sollte und damit deutliche Unterschiede im Resistenzverhalten auf YT im Vergleich zu M9 zeigen sollte. Wird hingegen die Expression des Proteins durch erhöhte Kopienzahl des Gens, wie es für die plasmidhaltigen Klone zutrifft, effektiver, sollte der Hemmeffekt der RNA-Polymerase weniger ins Gewicht fallen und Unterschiede des Wachstums auf Rifampicin-haltigem YT bzw. M9 nahezu aufgehoben sein, was sich für alle Klone weitgehend bestätigen ließ (Tabelle 14).

Allen Mutanten gemeinsam ist jedoch eine für die Klasse der Rifamycine spezifisch ausgeprägte Resistenz, die sich nicht auf andere hydrophobe Agentien auswirkt (Tropschug, 1981). Damit scheint mir ein unspezifisches Auflösen des hydrophoben Antibiotikums im Innern der Membran, nachfolgende Diffusion durch die Kohlenwasserstoffschicht und Verteilung, wie es Nikaido (1976) vorschlägt, relativ unwahrscheinlich. Die Ausbildung der Resistenz von Mutanten, Transduktanten und Klonen gegenüber einer Vielfalt von Rifamycinen (vgl. Seite 57), die sich in ihren am Naphtohydroquinon-Ring befindlichen Resten unterscheiden, läßt vermuten, daß die Wechselwirkung des Proteins mit dem Antibiotikum nicht allein auf das Rifamycinderivat Rifampicin beschränkt bleibt. Für die gegen RNA-Polymerase gerichtete inhibitorische Aktivität von Rifamycinen sind bestimmte strukturelle Voraussetzungen und Seitengruppen nötig, z. B. eine freie Hydroxylgruppe oder Ketogruppe an C1 und C8, eine freie Hydroxylgruppe an C21 und C23 und eine vollständige, ungebrochene Ansa-Brücke (Wehrli, 1977) (vgl. Fig. 1).

Eine genetische Kartierung dieser spezifisch für Rifamycine ausgeprägten Resistenz sollte eine deutliche Abgrenzung von RNA-Polymerase-Mutanten erlauben, indem die Mutation zur Rifampicin-Resistenz einem anderen Genort als den der RNA-Polymerase- β -Untereinheit zuzuordnen wäre.

Das Ergebnis der genetischen Kartierung meiner Mu-lysogenen Rifampicin-resistenten Mutanten konnte darum als deutlicher Hinweis für

die Existenz rpoB-unabhängiger Mutanten gedeutet werden, nachdem sich für alle vier getesteten, voneinander unabhängigen Mutanten übereinstimmend der Genort der Mu-Insertion, d. h. der Mutation zur Rifampicin-Resistenz im Bereich von 28 bis 37 min des E. coli-Chromosoms, angeben ließ.

Dieser Genombereich ist bisher noch durch wenige bekannte Gene charakterisiert; interessanterweise findet sich aber gerade hier eine Vielzahl von Genen, deren Expression mutierte Membranproteine zur Folge haben. Allen diesen Genen - envM bei 28 min (Egan and Russell, 1973), qmeA bei 28 min (Wijsman, 1972) und qmeE bei 37 min (Wijsman and Pafort, 1974) - ist die Synthese defekter Membranproteine gemeinsam, die im Gegensatz zu Wildtypzellen zu erhöhten Sensitivitäten gegenüber Antibiotika und Farbstoffen, z. B. Penicillin, Rifampicin und Acridinorange führen (Wijsman and Pafort, 1974; Egan and Russell, 1973). Aufgrund dieses gegenteiligen Effekts dieser Mutationen, d. h. der verstärkten Sensitivität gegenüber antibakteriellen Agentien, und der relativ unspezifisch entwickelten Empfindlichkeit der env/qme-Mutanten gegenüber Antibiotika scheint jedoch ein Zusammenhang mit der zwischen 28 und 37 min kartierenden Rifampicin-Resistenz nicht zu bestehen. Weitere Mutationen hingegen, die direkt das Antibiotikum Rifampicin betreffen, konnten von Dabbs (1982) und Dabbs and Looman (1981) bei den Genorten 84 min, 70.5 min und 35 min gefunden werden. Dabbs isolierte Mutanten, die zum Wachstum auf die Gegenwart von Rifampicin angewiesen waren, und nannte sie rid-Mutanten. Die Ausprägung dieses Rifampicin-abhängigen Phänotyps verlangte jedoch bei der Hälfte der Mutanten eine zusätzliche Mutation im rpoB-Gen.

Bei einer von rpoB-Mutationen unabhängigen Mutante (ridA, 70.5 min) konnte der konditional lethale Effekt von im Medium fehlenden Rifampicin spezifisch durch die Gegenwart von Kasugamycin kompensiert werden. Da der Zielort von Kasugamycin ribosomale Einheiten betrifft (Okuyama and Tanaka, 1972), scheint sich zwischen dem ridA-Genprodukt und dem Ribosom eine Wechselwirkung auszubilden (Dabbs and Looman, 1981). In unmittelbarer Nachbarschaft zum RNA-Polymerasegen der β -Untereinheit (90 min) befindet sich bei 89 min ein Gencluster ribosomaler Proteine (Lindahl et al., 1975; An and Friesen, 1980; Bachmann and Low, 1980), womit mein Verdacht erhärtet wird, daß es sich bei den rid-Mutanten aufgrund ribosomaler Interaktion des ridA-Genprodukts

wiederum um Mutanten handelt, die auf noch nicht geklärte Weise, evtl. durch polare Auswirkung der Mutation, indirekt die RNA-Polymerase betreffen. Aus diesem Befund ließe sich schließen, daß für den Phänotyp der Rifampicin-Abhängigkeit grundsätzlich Zweifachmutationen, d. h. einerseits *rid* und *rpoB*, andererseits *rid* und ribosomales Protein, nötig sind.

Da die Transduktion eines definierten Genabschnitts (vgl. Seite 24) bzw. die alleinige Transformation des Plasmids mit dem klonierten DNA-Fragment (vgl. Seite 60) für die Ausbildung der Rifampicin-Resistenz ausreicht, läßt sich unter anderem durch obige Schlußfolgerung der Kopplung zweier Mutationen ein Zusammenhang der *rid*-Mutanten mit den hier beschriebenen Rifampicin-resistenten Mutanten ausschließen.

Nachdem das Rifampicin-Resistenz vermittelnde Gen durch Shotgun-Klonierung der Mutante 5/3 und der Transduktante 10/1 t als Insert im Vektor pBR 322 zur Verfügung stand, konnte durch ein in vitro-Expressionssystem das exprimierte Proteinmuster analysiert und das Genprodukt erfaßt werden.

Allen Klonen konnte eine Proteinbande p58 zugeordnet werden, deren relative Molmasse von $58\,000 \pm 5\,000$ mit der Gengröße von ≤ 1800 bp (Fragmente 1u, 2f, 3t) gut in Einklang zu bringen ist. Das Auftreten zusätzlicher Banden p8, p10, p39, p45, p50 bei der Expression circularer Plasmide (Fig. 4 und 5), deren Eliminierung durch Einsetzen des isolierten chromosomalen Fragments bei vergleichbaren Versuchsbedingungen (5 µg DNA, 25 min Inkubation), gelingt, d. h. die den etwaigen Proteolyseprodukten des Proteins p58 zugeordneten Banden p8 bis p50 bleiben völlig aus, läßt sich somit durch die Bildung von Fusionsproteinen der chromosomalen mit der Vektor-DNA überzeugend erklären.

Der bei in vitro- und in vivo-Genexpressionsexperimenten bekannte Effekt der Abhängigkeit des Proteinbandenmusters von DNA-Menge, Inkubationsdauer, S-30-Extrakt etc. (Pratt, 1980; Crooks et al., 1983) läßt sich auch beim Einsetzen der klonierten DNA/Vektor im Zubay-System erkennen, da die Synthese fragmentspezifischer Proteine (incl. Fusionsproteine) bei Variation der eingesetzten DNA-Konzentration und der gewählten Inkubationsdauer unterschiedlich erfolgt (Fig. 3, Tabelle 17).

Offensichtlich findet eine Kompetition von Promotoren statt, die aufgrund veränderter Versuchsbedingungen unterschiedlich bevorzugt werden. Die für die meisten Klone optimale DNA-Konzentration betrug 4 µg pro Ansatz bei gleichzeitiger Inkubation von 25 min. Unter diesen Bedingungen wird der scheinbar relativ schwache Promotor des für das Protein p58 kodierenden Gens ausreichend favorisiert und dessen Expression für eine elektrophoretische Analyse zugänglich.

Einen weiteren Hinweis für die Reproduzierbarkeit des fragmentspezifischen Bandenmusters erlaubt der Vergleich der Proteine der Klone mit dem Proteinbandenmuster der durch Insertion des Kanamycin-Resistenzgens inaktivierten Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gene (Fig. 10). Alle den Fragmenten zugeordneten Proteine p10, p39, p45 und p58 der Klone 1u, 2f und 3d waren beim Einsatz der mutagenisierten Plasmide verschwunden. Die zusätzlich zum eigentlichen Genprodukt p58 als Fusionsproteine identifizierten Banden p10, p39 und p45 wurden bei den Kan^r-Gen enthaltenen Plasmiden aufgrund der veränderten Genstruktur nicht mehr synthetisiert.

Statt dessen trat eine neue Proteinbande der relativen Molmasse von 27 000 auf, welche dem Genprodukt des Kan^r-Gens (Aminoglycosidphosphotransferase = APH) (Fuhrmann and Hennecke, 1982) entspricht. Eine sehr schwache Bande der relativen Molmasse 9 000 tritt bei allen durch Insertion des Kanamycin-Resistenzgens mutagenisierten Klone auf und könnte einem aufgrund der Insertion abgebrochenen Translationsprodukt des jeweiligen Inserts entsprechen (Fig. 10).

Im Vergleich zu den in vitro durchgeführten Experimenten lassen sich die Ergebnisse der in Minizellen ausgeführten in vivo-Genexpression weitaus schwerer deuten. Unklar bleibt das auf die Klone 1u, 2f und 3t beschränkte Auftreten der Banden p45 und p58. Da es sich bei den hier genannten Klonen um die kleinsten klonierten Fragmente der Länge von ca. 1800 bp handelt, scheinen sich die zusätzlichen Sequenzen der übrigen Klone im in vivo-System störend auszuwirken. Die Möglichkeit, daß in nur einigen Minizellen proteolytische Effekte zum vorzeitigen Abbau der Genprodukte führen, erscheint relativ unwahrscheinlich, da die starke Intensität beider Banden, d. h. sowohl die von p58 als auch die von p45, bei der Verlängerung der Inkubationsdauer von 3 auf 15 Stunden (Fig. 11, Bahnen g, i und k) unverändert bleibt und somit auf

stabile, von Abbauprozessen unbeeinflusste Genprodukte schließen läßt.

Aus dem Befund, daß das Genprodukt p58 durch Rifampicin-Gegenwart nicht verstärkt exprimiert wird (vgl. Seite 87), läßt sich ableiten, daß das Antibiotikum keinen induzierenden Effekt auf die Expression des Resistenz vermittelnden Gens ausübt; daraus läßt sich weiterhin folgern, daß das Protein in jedem Falle - d. h. mit oder ohne selektiven Druck - synthetisiert wird, wie es z. B. für einen normalen Bestandteil der Bakterienmembran zu erwarten wäre. Im Einklang mit diesem Resultat stehen die Ergebnisse von Untersuchungen über das Wachstumsverhalten von Mutanten und Transduktanten in Abwesenheit bzw. Gegenwart von Rifampicin, wobei kein stimulierender bzw. restriktiver Effekt des Antibiotikums beobachtet wurde (Kollenda, 1981).

Ziel dieser Arbeit war es nicht, die Funktion des Proteins, d. h. letztlich den Resistenzmechanismus der Rifampicin-Resistenz, aufzuklären; jedoch lassen sich aufgrund der ermittelten Daten Hinweise auf die Resistenz ableiten.

Die von Tropschug (1980) isolierten Mutanten, die die Ausgangsbasis für die Transduktion und die Klonierung bildeten, waren durch die Kriterien von Rifampicin-Aufnahmemessungen und durch die von Natriumdesoxycholat - das als Detergenz zum teilweisen Auflösen der Zellhülle und damit Aufheben der Membranbarrierefunktion führt - bewirkte, dem Wildtyp vergleichbare Rifampicin-Empfindlichkeit der Mutanten (Tropschug, 1981) einmal eindeutig von rpoB-Mutanten abgegrenzt worden; zugleich aber führten diese Kriterien zur Hypothese, daß es sich hierbei um eindringungsresistente oder sog. Permeationsmutanten handeln könnte (Tropschug, 1981). Allerdings ist hier zu berücksichtigen, daß die Aufnahmemessungen von Rifampicin aufgrund optischer Spektren die Möglichkeit eines enzymatischen Abbaumechanismus für Rifampicin nicht ausschließen können, da die Inaktivierung des Antibiotikums nicht zwingend mit einer spektroskopisch erfaßbaren Veränderung, d. h. strukturellen Alteration des Chromophors, begleitet sein muß. So sind Derivate von Rifamycinen bekannt, denen z. B. die Acetylgruppe an C25 fehlt oder die eine zusätzliche freie Carboxylgruppe am Rest 2 (C4) des Rifamycin B besitzen, die jeweils in der Lage sind, isolierte sensitive RNA-Polymerase zu hemmen, hingegen in wachsenden Bakterien-

kulturen keine inhibitorische Wirkung entfalten, wobei die intakte Zellmembran offensichtlich für diese Rifamycin-Derivate nicht permeierbar ist (Riva and Silvestri, 1972; Wehrli and Staehelin, 1969; Nikiforov et al., 1982).

Auf der anderen Seite konnte bisher ein Enzym, das Ansamycine chemisch modifiziert oder spaltet und es damit inaktiviert, nicht entdeckt werden (Wehrli, 1977; Wehrli and Staehelin, 1969), auch wenn für eine enzymatische Detoxifizierung bzw. Veränderung der Permeationseigenschaften des Antibiotikums eine Vielzahl von Angriffspunkten am Rifamycin-Molekül existieren, wo z. B. die Abtrennung oder Oxidation einer essentiellen Hydroxylgruppe ausreichen würde (vgl. Fig. 1).

Mir scheint allerdings, begründet durch die Ausprägung der Resistenz gegen die unterschiedlichsten Rifamycin-Derivate, ein Protein wahrscheinlicher, das sich einmal an den groben strukturellen Gegebenheiten des Antibiotikums - wie dem Ansa-System und dem Chromophor - orientiert, zugleich aber eine spezifische Wechselwirkung mit einer für die Aktivität oder Penetration entscheidenden funktionellen Gruppe des Rifamycins ausbildet und dadurch das Eindringen in die Zelle verhindert. Nachdem Rifampicin passiv, d. h. ohne aktiven Transport bzw. Energieverbrauch, die Permeabilitätsbarriere der Zelle überwindet (White and Lancini, 1971), könnte das Antibiotikum durch die Bindung an ein Membranprotein in die Zelle eingeschleust werden.

Das in der Literatur bisher beschriebene Protein, das spezifisch Rifampicin zu binden vermag, ist jedoch das ubiquitär, d. h. in Wildtypzellen, wie auch in Rifampicin-resistenten Mutanten auftretende *rb* - Protein der relativen Molmasse von 36 500 (Seydel, 1978; Trop-schug, 1981). Aufgrund der von Seydel (1978) ermittelten Bindungskonstante des *rb* - Proteins für Rifampicin von $k = 10^{-4}$, die sich mit dem bereits bei der Konzentration von $10^{-8}M$ (Wehrli, 1977) deutlich wirksamen inhibitorischen Effekt des Rifampicins nicht korrelieren läßt, scheint somit das *rb* - Protein vielleicht für die Penetration, jedoch für die spezifische Resistenzursache keine primäre Bedeutung zu besitzen.

Auch aus Untersuchungen mit Rifampicin, das in nicht lethalen Dosen (30 µg/ml) in sensitiven Zellen auf die Proteinsynthese einen differenzierten Einfluß insofern ausübt, als es die Expression bestimmter

Proteine stimuliert und induziert, die Expression anderer Proteine hingegen reprimiert (Bass et al., 1980; Gorlenko et al., 1980), ließen sich keine Hinweise auf evtl. beim Transport bzw. bei der Resistenz-Ausprägung beteiligte Proteine entnehmen.

Analysen der Membranzusammensetzung, deren Veränderung als Resistenzursache vermutet wurde, konnten jedoch weder in den Lipiden noch in dem für die Penetration hydrophober Substanzen entscheidenden Lipopolysaccharid der äußeren Membran (Nikaido, 1976; Leive and Shovlin, 1968) Unterschiede zwischen Mutanten und Wildtyp aufdecken (Tropschug, 1981).

Nachdem sich Proteinveränderungen häufig in veränderten Permeationseigenschaften auswirken (Ames, 1974; Kadner and Bassford Jr., 1978) und vielen Proteinen Transportfunktion zukommt (Boos, 1974), konzentrierten sich die Untersuchungen insbesondere auf die Proteinkomposition der äußeren Membran.

Die Vergleiche der Membranproteine von Rifampicin-resistenten Mutanten und deren Wildtyp ließen einige Unterschiede sowohl der inneren als auch der äußeren Membran erkennen (Kollenda, 1981). Diese Proteinveränderungen verloren jedoch wieder an Bedeutung, nachdem bei einer Pl-Transduktion des Resistenz vermittelnden Gens in den Wildtypstamm diese Unterschiede nahezu aufgehoben waren. Die einzigen bleibenden Proteinveränderungen, deren Auftreten jedoch außerordentlich von der Wachstumsphase und dem gewählten Nährmedium abhingen, betrafen zwei Proteine mit der relativen Molmasse von 50 000 bzw. 100 000.

Membrandefekte der äußeren Membran, die sich durch ein allgemein verändertes Permeationsverhalten der Zelle und insbesondere gegenüber hydrophoben Antibiotika, z. B. Actinomycin D, Novobiocin, Rifampicin (Nikaido, 1976; Sonntag et al., 1978), äußern, konnten bisher für die sog. Hauptproteine (omp Gene) (Henning and Haller, 1975; Henning et al., 1978; Yagil et al., 1978; Lee et al., 1979), deren relative Molmassen zwischen 34 000 und 42 000 liegen, und für das kovalent gebundene Lipoprotein (lpp Gen) (Suzuki et al., 1978; Sonntag et al., 1978) mit Mr 7 500 gefunden werden. Die Wirkung beider Mutationen, omp und lpp, beruht auf strukturellen Veränderungen und hat zum Teil drastische Alterationen der Oberflächenverhältnisse und der Morphologie zur Folge.

Aufgrund der hohen Kopienzahl der im Wildtyp auftretenden Proteine

omp und lpp (Henning et al., 1978; Braun and Hantke, 1974) sind beide Membrandefekte für eine elektrophoretische Analyse gut zugänglich. Keine der bei den Rifampicin-resistenten Transduktanten gefundenen Proteinveränderungen konnten bezüglich der Molmasse und der Häufigkeit mit den oben beschriebenen Membrandefekten korreliert werden (Kollenda, 1981).

Ergänzend zu dem Resultat der vergleichenden Membranuntersuchungen von durch Mu-Insertion mutagenisierten Rifampicin-resistenten Mutanten, bei denen nicht, wie erwartet, in der Genexpression das Verschwinden von Proteinbanden beobachtet wurde, schien festzustehen, daß die Ausprägung der Rifampicin-Resistenz in einer Bakterienpopulation vermutlich durch ein Protein bewirkt wird, dessen prozentualer Anteil innerhalb der Membran $< 1\%$ sein muß, also außerhalb der Nachweisgrenze der meisten Methoden liegt. Vielleicht handelt es sich um ein Protein, dessen Mutation zur vermuteten Eindringungsresistenz durch eine missense-Mutation, wie es bei den meist essentiellen Membranproteinen häufig vorkommt (Machtiger and Fox, 1973; Wijsman and Pafort, 1974), oder durch eine kleine Insertion/Deletion verursacht wird und somit ebenfalls durch einen elektrophoretischen Proteinvergleich nicht erfaßbar ist.

Durch Klonieren und die Anwendung des weitaus empfindlicheren Systems der in vitro- und in vivo-Genexpression konnte das Genprodukt des Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gens identifiziert werden, dessen Sequenz sich vermutlich vom Wildtyp nur geringfügig unterscheidet, für das Verhalten der Bakterienzelle gegenüber Rifampicin aber erstaunliche Veränderungen bewirkt.

Die Funktion und Lokalisation dieses Proteins wird sich letztlich nur durch dessen Isolierung und Charakterisierung aufklären lassen und bleibt weiteren Arbeiten vorbehalten.

Anhang 1

Zusammenhang der Rifampicin-Resistenz mit Proteinen des Eisen-Rezeptorkomplexes

Nach der Isolierung und Trennung von äußerer und innerer Membran von Zellen des frühlogarithmischen Wachstums (OD 0.5 bei 660 nm) in M9 zeigte die gelelektrophoretische Analyse von Proteinen der äußeren Membran auf 11% SDS/PAA-Gelen (Trennlänge 10 cm) folgende Unterschiede (Kollenda, 1981):

Proteinbande Mr	Bakterienstamm	Intensität
83 000 *	AB 1157	+++
	5/3	-
	5/3 t	+++
	10/1	+
	10/1 t	+++
81 000 *	AB 1157	+++
	5/3	+
	5/3 t	+++
	10/1	++
	10/1 t	+++
74 000 *	AB 1157	+++
	5/3	+
	5/3 t	+++
	10/1	++
	10/1 t	+++

Legende: Klassifizierung zur Intensität der Proteinbanden

- = Bande fehlt
- + = Bande schwach ausgeprägt
- ++ = Bande bereits deutlich ausgeprägt
- +++ = Bande in hohem Maße ausgeprägt

* Diese Proteinbanden waren als Eisenrezeptorproteine definiert worden (Kollenda, 1981, Seite 100).

Der bei den Mutanten 5/3 bzw. 10/1 auffällige Unterschied bei allen drei Eisenrezeptorproteinen im Vergleich zum Wildtyp AB 1157 war bei den Transduktanten 5/3 t und 10/1 t verschwunden, womit die Eisen-Rezeptorproteine für die Rifampicin-Resistenz keine primäre Bedeutung zu besitzen scheinen. Ein eindeutiger Beweis konnte aber nur eine Analyse der Resistenzeigenschaften von Eisenaufnahmemutanten liefern.

Untersuchung der Rifampicin-Resistenz von Eisenaufnahmemutanten

1 µl von Übernachtskulturen der Mutanten, aufgeführt in Tabelle 22, wurden auf YT-Platten mit steigender Konzentration an Rifampicin (von 0 bis 50 µg/ml) ausgestrichen und 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Es zeigte sich, daß sich die getesteten Eisenaufnahmemutanten in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Rifampicin nicht wesentlich vom Wildtyp unterscheiden.

Tabelle 22 Minimale Hemmkonzentrationen für Rifampicin von Eisenaufnahmemutanten im Vergleich zu deren Wildtyp E. coli AB 2847

Bakterien stamm	Phänotyp bezgl. Fe-Stoffwechsel	Minimale Hemm- konz. in YT [µg/ml] Rif	Resistenz- faktor
AB 2847	Wildtyp	10	1
JR 20	fep A	35	3.5
VR 42	cir, feu A	25	2.5
BR 158	ton B	10	1
JR 20191	cir, fep A, ton A	25	2.5
WA 1031	fep A, fec A	35	3.5
H 1388	exb B	10	1

Die Bakterienstämme wurden mir freundlicherweise von Herrn Dr. K. Hantke, Tübingen, zur Verfügung gestellt.

Erläuterung zu Tabelle 22

Phänotyp	Funktion, biologische & unphysiologische	Lokalisation im Chromosom	Proteinprodukt	Literatur
		min	Mr	
fep A	Fe ³⁺ -Enterochelin Colicin B Resistenz	13	ca. 82 000	Hantke (1981)
fec A	Fe ³⁺ -Citrat	7	ca. 80 000	Wagegg and Braun (1981)
fhu A = ton A	Fe ³⁺ -Ferrichrom T1, T5, φ80, Colicin M Resistenz	3,5	78 000 & 81 000	Pecker and Braun (1983)
ton B	alle Fe-Aufnahmesysteme Vit B12 Transport Albomycin-Resistenz essentiell für T1, φ 80, Colicin M, B, I Resist.	27	vermutl. 74 000 81 000 83 000	Braun (1981)
cir (äußere Membran)	induziert bei Fe-Mangel Colicin I Resistenz	44	ca. 74 000	Braun (1981)
exb B	Enterochelin Excretion	64	85 000 & 92 000	Pugsley and Reeves (1976)
feu A	Ferric-Enterochelin- Aufnahme	zw. 60 & 75	vermutl. 74 000	Braun et al. (1976)

Anhang 2

Klonierung des Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gens aus den E. coli-Mutanten 5/3 und 10/1 t

Das Plasmid pHE3 trägt ein dominantes p-Fluorphenylalanin (pfp)-Sensitivitätsgen, das eine PstI-Schnittstelle, die sich zur Klonierung von Fremd-DNA eignet, enthält. Außerdem befindet sich auf dem Plasmid das Gen der Chloramphenicol-Resistenz (cam^r) (Hennecke et al., 1982). In Kombination mit dem Vektor pHE3 wird der Rezipientenstamm E. coli RR28 benutzt, der seinerseits eine rezessive pfp-Resistenz besitzt. Bei der Transformation eines Wildtypplasmids in RR28 erhält man pfp-sensitive, Chloramphenicol-resistente Klone. Transformiert man hingegen mit inserthaltigen Plasmiden, so vermögen die Transformanden nun auf pfp- und Chloramphenicol-haltigem Agar zu wachsen, da durch die Insertion von Fremd-DNA das dominante pfp^S-Gen des Plasmids inaktiviert wurde. Dieses System erlaubt damit eine direkte Selektion auf inserthaltige Plasmide.

Das Plasmid pHE3 wurde unter Zusatz von 200 µg/ml Spectinomycin im Wachstumsmedium (Chang und Chen, 1978) isoliert (vgl. Seite 18) und mit PstI linearisiert. Zur Verbesserung der Ausbeuten für eine nachfolgende Ligationsreaktion mit chromosomaler DNA wurde durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase 5'-Phosphat abgetrennt, um eine Recircularisierung des Plasmids zu verhindern (Methodenteil Seite 19).

Aus beiden voneinander unabhängigen Mutanten 5/3 und 10/1 t wurde chromosomale DNA isoliert (Seite 19) und mit PstI partiell geschnitten. Anhand von Agarosegelen wurde die optimale Inkubationsdauer der einzelnen DNA-Präparationen ermittelt, wobei bevorzugt Fragmente der Größenordnung von 1000 bis 3000 bp erhalten wurden. Die günstigste Inkubationsdauer der Spaltung mit dem Restriktionsenzym stellte sich als 3 bis 4 Stunden heraus. Die geschnittene DNA wurde phenolisiert und in unterschiedlichen Verhältnissen (2-5:1) mit dem PstI linearisierten Vektor pHE3 ligiert (Methodenteil Seite 20). Die Transformation erfolgte in den Stamm RR28.

Die Transformationsansätze wurden auf Minimalmedium, supplementiert mit leu, pro, thi und mit Zusätzen von 20 µg/ml Chloramphenicol und 200 µg/ml p-Fluorphenylalanin, ausgestrichen.

Die besten Transformationsraten von 10^5 bis 10^6 Transformanden pro µg DNA wurden bei dem Verhältnis chromosomaler DNA zu Plasmid-DNA von 3:1 und einer Gesamt-DNA-Konzentration von 200-500 ng/ml im Ligationsansatz erhalten.

Klone, die nach 48 h Inkubation bei 37°C gewachsen waren, wurden auf Rifampicin-Resistenz durch Einzelkolonie-Überimpfen getestet und bei auftretender Rifampicin-Resistenz nachfolgend im Schnellaufschluß analysiert.

Folgende Klone wurden isoliert:

aus dem Stamm 5/3 abgeleitet: 5, 16/1, 16/2, 17/1, 17/3

aus der Transduktante 10/1 t abgeleitet : 1, 2, 14, 15, 20.

Die Voraussetzung der wiederholten Transformierbarkeit der Rifampicin-Resistenz wurde durch die Isolierung der inserthaltigen Plasmide der oben genannten Klone und erneute Transformation von HB101 bzw. DH1 kontrolliert. Die erwartete Rifampicin-Resistenz der Transformanden konnte jedoch im Experiment nicht bestätigt werden. Darum wurden die Klone zu weiteren Untersuchungen nicht herangezogen.

Aus Zeitgründen habe ich weitere Klonierungsversuche mit diesem System nicht unternommen.

Literaturverzeichnis

- Adler, A. I., Fisher, W. D., Cohen, A. & Hardigree, A. A. (1967)
Miniature Escherichia coli cells deficient in DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **57**, 321-326
- Ames, G. F.-L. (1974)
Resolution of Bacterial Proteins by Polyacrylamide Gel Electrophoresis on Slabs
J. Biol. Chem. **249**, 634-644
- An, G. & Friesen, J. D. (1980)
Characterization of Promoter-Cloning Plasmids: Analysis of Operon Structure in the rif Region of Escherichia coli and Isolation of an Enhanced Internal Promoter Mutant
J. Bacteriol. **144**, 904-916
- Appleyard, R. K. (1954)
Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from Escherichia coli K-12
Genetics **39**, 440-552
- Bachmann, B. J. (1972)
Pedigrees of Some Mutant Strains of Escherichia coli K-12
Bacteriol. Rev. **36**, 525-557
- Bachmann, B. J. & Low, K. B. (1980)
Linkage Map of Escherichia coli K-12, Edition 6
Microbiol. Rev. **44**, 1-56
- Bade, E. G., Howe, M. M. & Rawluk, L. (1978)
Preferential Transduction by Phage Mu
Mol. Gen. Genet. **160**, 89-94
- Barnes, W. M. (1977)
Plasmid Detection and Sizing in Single Colony Lysates
Science **195**, 393-394
- Bass, I. A., Danilevskaya, O. N., Mekhedov, S. L., Gorlenko, Zh. M., Fedoseeva, V. B. & Dolganov, G. M. (1980)
Effect of Rifampicin on the Rate of mRNA Synthesis by Bacterial RNA Polymerase studied with the Aid of Hybrid Plasmids
Mol Biol. **13**, 806-815

- Benveniste, R. & Davies, J. (1973)
Mechanism of Antibiotic Resistance in Bacteria
Ann. Rev. Biochem. **42**, 471-506
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Hey-
necker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H. & Falkow, S. (1977)
Construction and Characterization of New Cloning Vehicles,
II A Multipurpose Cloning System
Gene **2**, 95-113
- Boos, W. (1974)
Bacterial Transport
Ann. Rev. Biochem. **43**, 123-146
- Boram, W. & Abelson, J. (1971)
Bacteriophage Mu Integration: On the Mechanism of Mu-induced
Mutations
J. Mol. Biol. **62**, 171-178
- Boyer, H. W. & Roulland-Dussoix, D. (1969)
A Complementation Analysis of the Restriction and Modification
of DNA in Escherichia coli
J. Mol. Biol. **41**, 459-472
- Brack, R. (1983)
In vitro Transcription of the Escherichia coli Plasmid pBR 322
with RNA Polymerase from Micrococcus luteus
Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München
- Braun, V. (1977)
Membranpermeation und Antibiotika Resistenz bei Bakterien
Naturwissenschaften **64**, 126-132
- Braun, V. (1981)
Eisenversorgung und Virulenz bei Escherichia coli
Forum Mikrobiologie **4**, 69-72
- Braun, V., Hancock, R. E. W., Hantke, K. & Hartmann, A. L. (1976)
Functional Organization of the Outer Membrane of Escherichia
coli: Phage and Colicin Receptors as Components of Iron Uptake
Systems
J. Supramol. Struct. **5**, 37-58
- Braun, V. & Hantke, K. (1974)
Biochemistry of Bacterial Envelopes
Ann. Rev. Biochem. **43**, 89-121

- Bukhari, A. I. (1975)
Reversal of Mutator Phage Mu Integration
J. Mol. Biol. **96**, 87-99
- Bukhari, A. I. (1976)
Bacteriophage Mu as a Transposition Element
Ann. Rev. Genet. **10**, 389-412
- Bukhari, A. I. & Taylor, A. L. (1971)
Genetic Analysis of Diaminopimelic Acid- and Lysine-Requiring Mutants of Escherichia coli
J. Bacteriol. **105**, 844-854
- Burman, L. G., Nordström, K. & Bloom, G. D. (1972)
Murein and the Outer Penetration Barrier of Escherichia coli K-12, Proteus mirabilis, and Pseudomonas aeruginosa
J. Bacteriol. **112**, 1364-1374
- Caro, L. & Berg, C. M (1971)
P1 Transduction
Meth. Enzym. **XXI**, 444-458
- Chang, A. C. Y. & Cohen, S. N. (1978)
Construction and Characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid
J. Bacteriol. **134**, 1141-1156
- Chen, H.-Z. & Zubay, G. (1983)
Procaryotic Coupled Transcription-Translation
Meth. Enzym. **101**, 674-690
- Collins, J. (1979)
Cell-free Synthesis of Proteins coding for Mobilisation Functions of ColE1 and Transcription Functions of Tn3
Gene **6**, 29-42
- Crooks, J. H., Ullman, M., Zoller, M. & Levy, S. B. (1983)
Transcription of Plasmid DNA in Escherichia coli Minicells
Plasmid **10**, 66-72
- Dabbs, E. R. (1982)
Three Additional Loci of Rifampicin Dependence in Escherichia coli
Mol. Gen. Genet. **187**, 519-522

- Dabbs, E. R. & Looman, K. (1981)
An Antibiotic Dependent Conditional Lethal Mutant with a Lesion
Affecting Transcription and Translation
Mol. Gen. Genet. **184**, 224-229
- Daniell, E., Roberts, R. & Abelson, J. (1972)
Mutations in the Lactose Operon Caused by Bacteriophage Mu
J. Mol. Biol. **69**, 1-8
- Davis, B. D. & Tai, P.-C. (1980)
The mechanism of protein secretion across membranes
Nature **283**, 433-438
- diMauro, E., Snyder, L., Marino, P., Lamberti, A., Coppo, A. &
Tocchini-Valentini, G. P. (1969)
Rifampicin Sensitivity of the Components of DNA-dependent RNA
Polymerase
Nature **222**, 533-537
- DiRienzo, J. M., Nakamura, K. & Inouye, M. (1978)
The Outer Membrane Proteins of Gram-negative Bacteria: Bio-
synthesis, Assembly, and Functions
Ann. Rev. Biochem. **47**, 481-532
- Dougan, G. & Sherratt, D. (1977)
The Transposon Tn1 as a Probe for Studying ColE1 Structure and
Function
Mol. Gen. Genet. **151**, 151-160
- Egan, A. F. & Russell, R. R. B. (1973)
Conditional mutations affecting the cell envelope of Escherichia
coli
Genet. Res. **21**, 139-152
- Faelen, M. & Toussaint, A. (1976)
Bacteriophage Mu-1: A Tool to Transpose and to Localize Bacterial
Genes
J. Mol. Biol. **104**, 525-539
- Fecker, L. & Braun, V. (1983)
Cloning and Expression of the fhu Genes Involved in Iron (III)-
Hydroxamate Uptake by Escherichia coli
J. Bacteriol. **156**, 1301-1314

- Foulds, J. & Chai, T.-J. (1978)
New Major Outer Membrane Protein found in an Escherichia coli
tolF Mutant Resistant to Bacteriophage Tu1b
J. Bacteriol. **133**, 1478-1483
- Franklin, T. J. (1974)
Factors Affecting the Penetration of Antibiotics into Bacteria
in "Industrial Aspects of Biochemistry", (Spencer, B., ed.),
30, 549-575, North Holland, Amsterdam
- Franklin, T. J. & Snow, G. A. (1975)
Biochemistry of Antimicrobial Action
Halsted Press, New York
- Frazer, A. C. & Curtiss III, R. (1975)
Production, properties and utility of bacterial minicells
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **69**, 1-84
- Fuhrmann, M. & Hennecke, H. (1982)
Coding Properties of cloned Nitrogenase Structural Genes from
Rhizobium japonicum
Mol. Gen. Genet. **187**, 419-425
- Goodenough, U. & Levine, R. P. (1975)
in "Genetics", pp. 410-430
M & A Thomson Litho, East Kilbride, Scotland
- Gorlenko, Zh. M., Afanas'ev, V. M. & Yarulin, V. R. (1980)
Influence of Rifampicin and a Mutation that Changes RNA Poly-
merase on the Spectrum of Protein Synthesized by Escherichia
coli Cells
Mol. Biol. **13**, 1056-1064
- Gorovsky, M. A., Carlson, K. & Rosenbaum, J. L. (1970)
Simple Method für Quantitative Densitometry of Polyacrylamide
Gels Using Fast Green
Anal. Biochem. **35**, 359-370
- Hanahan, D. (1983)
Studies on Transformation of Escherichia coli with Plasmids
J. Mol. Biol. **166**, 557-580
- Hancock, R. E. W. & Braun, V. (1976)
The Colicin I Receptor of Escherichia coli K-12 has a Role in
Enterochelin-Mediated Iron Transport
FEBS Lett. **65**, 208-210

- Hantke, K. (1978)
Major Outer Membrane Proteins of E. coli K-12 Serve as Receptors
for the Phages T2 (Protein Ia) and 434 (Protein Ib)
Mol. Gen. Genet. **164**, 131-135
- Hantke, K. (1981)
Regulation of Ferric Iron Transport in Escherichia coli K-12:
Isolation of a Constitutive Mutant
Mol. Gen. Genet. **182**, 288-292
- Hartmann, G. R., Heinrich, P., Kollenda, M. C., Skrobranek, B., Trop-
schug, M. & Weiß, W. (1985)
Molekulare Wirkungsweise des Antibiotikums Rifampicin
Angew. Chem. im Druck
- Hayes, W. (1968)
The Genetics of Bacteria and their Viruses
Blackwell Scientific Publication, Oxford
- Heil, A. & Zillig, W. (1970)
Reconstitution of Bacterial DNA-dependent RNA Polymerase from
isolated Subunits as a Tool for the Elucidation of the Role
of the Subunits in Transcription
FEBS Lett. **11**, 165-168
- Hennecke, H., Günther, I. & Binder, F. (1982)
A novel cloning vector for the direct selection of recombinant
DNA in E. coli
Gene **19**, 231-243
- Henning, U. & Haller, I. (1975)
Mutants of Escherichia coli K-12 Lacking all "Major" Proteins
of the Outer Cell Envelope Membrane
FEBS Lett. **55**, 161-164
- Henning, U., Sonntag, I. & Hindenach, I. (1978)
Mutants (ompA) Affecting a Major Outer Membrane Protein of
Escherichia coli K-12
Eur. J. Biochem. **92**, 491-498
- Höltje, J.-V. (1979)
Die Aufnahme von Antibiotika in die Bakterienzelle
Forum Mikrobiologie **5**, 249-255

- Humphreys, G. O., Willshaw, G. A. & Anderson, E. S. (1975)
A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA
Biochim. Biophys. Acta **383**, 457-463
- Jacob, F. & Wollmann, E. L. (1961)
Zygotic Induction and its Genetic Effects
in "The Sexuality and Genetics of Bacteria", pp. 93-108
Academic Press, New York
- Jacoby, G. A. & Gorini, L. (1967)
The Effect of Streptomycin and other Aminoglycoside Antibiotics on Protein Synthesis
in "Antibiotics, Mechanism of Action", (Gottlieb, D. & Shaw, P. D., eds) Vol I, pp. 726-747
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Kadner, R. J. (1978)
Transport of Vitamins and Antibiotics
in "Bacterial Transport", Microbiology Series **4**, (Rosen, B. P., ed.), pp. 463-493
Marcel Dekker, Inc., New York, Basel
- Kadner, R. J. & Bassford Jr., P. J. (1978)
The Role of the Outer Membrane in Active Transport
in "Bacterial Transport", Microbiology Series **4**, (Rosen, B. P., ed.), pp. 414-457
Marcel Dekker, Inc., New York, Basel
- Kahmann, R. & Kamp, D. (1979)
Nucleotide sequences of the attachment sites of bacteriophage Mu DNA
Nature **280**, 247-250
- Kersten, H. & Kersten, W. (1974)
Inhibitors of Nucleic Acid Synthesis
in "Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics", (Kleinzelner, A., Springer, G. F. & William, M. G., eds.), Vol **18**, pp. 108-122
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Kessler, C. (1979)
Die Wirkung des Antibiotikums Rifampicin auf den Beginn der Escherichia coli RNA Polymerasereaktion
Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München

- Khesin, R. B., Gorlenko, Zh. M., Shemyakin, M. F., Stvolinsky, S. L., Mindlin, S. Z. & Ilyina, T. S. (1969)
Studies on the Function of the RNA Polymerase Components by Means of Mutations
Mol. Gen. Genet. **105**, 243-261
- Koch, A. L. (1981)
Evolution of Antibiotic Resistance Gene Function
Microbiol. Rev. **45**, 355-378
- Koch, A. L. & Gross, G. H. (1979)
Growth Conditions and Rifampicin Susceptibility
Antimicrob. Agents Chemother. **15**, 220-228
- Kollenda, M. C. (1981)
Vergleichende Membranuntersuchungen an Rifampicin-Eindringungs-resistenten Mutanten und Transduktanten von Escherichia coli
Diplomarbeit, Ludwig-Maximilian-Universität, München
- Laemmli, U. K. (1970)
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4
Nature **227**, 680-685
- Leach, D. & Symonds, N. (1979)
The Isolation and Characterization of a Plaque-Forming Derivative of Bacteriophage Mu Carrying a Fragment of Tn3 Conferring Ampicillin Resistance
Mol. Gen. Genet. **172**, 179-184
- Lee, D. R., Schnaitman, C. A. & Pugsley, A. P. (1979)
Chemical Heterogeneity of Major Outer Membrane Pore Proteins of Escherichia coli
J. Bacteriol. **138**, 861-870
- Leive, L. & Shovlin, V. K. (1968)
Physical, Chemical, and Immunological Properties of Lipopolysaccharide Released from Escherichia coli by Ethylenediamine-tetraacetate
J. Biol. Chem. **243**, 6384-6391
- Lennox, E. S. (1955)
Transduction of Linked Genetic Characters of the Host by Bacteriophage P1
Virology **1**, 190-206

- Levy, S. B. & McMurry, L. (1974)
Detection of an inducible Membrane Protein Associated with
R-Factor Mediated Tetracyclin Resistance
Biochem. Biophys. Res. Comm. **56**, 1060-1068
- Lindahl, L., Jaskunas, S. R., Dennis, P.P. & Nomura, M. (1975)
Cluster of genes in Escherichia coli for ribosomal proteins,
ribosomal RNA, and RNA Polymerase subunits
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 2743-2747
- Low, B. (1968)
Formation of Merodiploids in Matings with a Class of Rec⁻
Recipient Strains of Escherichia coli K-12
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **60**, 160-167
- Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., van der Hoek, P. & van Alphen, L.
(1975)
Electrophoretic Resolution of the "Major Outer Membrane Protein"
of Escherichia coli K-12 into Four Bands
FEBS Lett. **58**, 254-258
- Lugtenberg, B., Peters, R., Bernheimer, H. & Berendsen, W. (1976)
Influence of Cultural Conditions and Mutations on the Compo-
sition of the Outer Membrane Proteins of Escherichia coli
Mol. Gen. Genet. **147**, 251-262
- Machtiger, N. A. & Fox, C. F. (1973)
Biochemistry of Bacterial Membranes
Ann. Rev. Biochem. **42**, 575-600
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982)
Molecular Cloning - A Laboratory Manual
Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Masters, M. (1977)
The Frequence of P1 Transduction of the Genes of Escherichia coli
as a Function of Chromosomal Position: Preferential Trans-
duction of the Origin of Replication
Mol. Gen. Genet. **155**, 197-202
- McCarthy, J. E. G., Schairer, H. U. & Sebald, W. (1985)
Translational Initiation Frequency of atp Genes from Escherichia coli:
Identification of an Intercistronic Sequence that en-
hances Translation
EMBO J. **4**, 519-526

- Meagher, R. B., Tait, R. C. Betlach, M. & Boyer, H. W. (1977)
Protein Expression in E. coli Minicells by Recombinant Plasmids
Cell **10**, 521-536
- Miller, J. H. (1972)
Experiments in Molecular Genetics, pp. 63 ff.
Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Mindlin, S. Z., Ilyina, T. S., Voeykova, T. A. & Velkov, V. V. (1972)
Genetical Analysis of Rifampicin Resistant Mutants of E. coli K-12
Mol. Gen. Genet. **115**, 115-121
- Nakae, T. & Nikaido, H. (1975)
Outer Membrane as a Diffusion Barrier in Salmonella typhimurium
J. Biol. Chem. **250**, 7359-7365
- Nikaido, H. (1976)
Outer Membrane of Salmonella typhimurium Transmembrane Diffusion
of some Hydrophobic Substances
Biochim. Biophys. Acta **433**, 118-132
- Nikaido, H. (1979)
Die Permeabilität der äußeren Bakterienmembran
Angew. Chem. **91**, 394-407
- Nikiforov, V. G., Trapkova, A. A., Gragerov, A. I. & Maslin, D. N.
(1982)
A derivative of rifamycin SV inhibiting rifampicin-resistant
RNA polymerase of Escherichia coli
FEBS Lett. **150**, 416-418
- Okuyama, A. & Tanaka, N. (1972)
Differential Effects of Aminoglycosides on Cistron specific
Initiation of Protein Synthesis
Biochem. Biophys. Res. Comm. **49**, 951-957
- Osborn, M. J., Gander, J. E., Parisi, E. & Carson, J. (1972)
Mechanism of Assembly of the Outer Membrane of Salmonella
typhimurium; Isolation and Characterization of Cytoplasmic and
Outer Membrane
J. Biol. Chem. **247**, 3962-3972
- Osborn, M. J. & Munson, R. (1974)
Separation of the Inner (Cytoplasmic) and Outer Membrane of
Gram-Negative Bacteria
Meth. Enzym. **XXXI**, 642-653

- Ovchinnikov, Y. A., Monastyrskaya, G. S., Guriev, S. O., Kalinina, N. F., Sverdlov, E. D., Gragerov, A. I., Bass, I. A., Kiver, I. F., Moiseyeva, E. P., Igumnov, V. N., Mindlin, S. Z., Nikiforov, V. G., & Khesin, R. B. (1983)
RNA Polymerase Rifampicin Resistance Mutations in Escherichia coli: Sequence Changes and Dominance
Mol. Gen. Genet. **190**, 344-348
- Palva, E. T., Hirst, T. R., Hardy, S. J., Holmgren, J. & Randall, L. (1981)
Synthesis of a Precursor to the B Subunit of Heat-Labile Enterotoxin in Escherichia coli
J. Bacteriol. **146**, 325-330
- Petrenik, I. F., Mindlin, S. Z., Moiseyeva, E. P. & Bass, I. A. (1984)
Dominant Mutations of Rifampicin Resistance in Escherichia coli K-12
Genetika (USSR) **20**, 1798-1810
- Pittard, J. & Wallace, B. C. (1966)
Distribution and Function of Genes Concerned with Aromatic Biosynthesis in Escherichia coli
J. Bacteriol. **91**, 1494-1508
- Poehling, H.-M. & Neuhoﬀ, V. (1981)
Visualization of proteins with a silver "stain": A critical analysis
Electrophoresis **2**, 141-147
- Pratt, C. (1980)
Kinetics and Regulation of Cell-Free Alkaline Phosphatase Synthesis
J. Bacteriol. **143**, 1265-1274
- Pratt, J. M., Boulnois, G. J., Darby, V., Orr, E., Wahle, E. & Holland, I. B. (1981)
Identification of gene products programmed by restriction endonuclease DNA fragments using an E. coli in vitro system
Nucl. Acids Res. **9**, 4459-4474
- Pugsley, A. P. & Reeves, P. (1976)
Characterization of Group B Colicin-Resistant Mutants of Escherichia coli K-12: Colicin Resistance and the Role of Enterochelin
J. Bacteriol. **127**, 218-228

- Reeve, J. N. (1978)
Selective expression of transduced or cloned DNA in minicells containing plasmid pKB 280
Nature **276**, 728-729
- Reeve, J. (1979)
Use of Minicells for Bacteriophage-Directed Polypeptide Synthesis
Meth. Enzym. **68**, 493-503
- Reiner, A. M. (1969)
Isolation and Mapping of Polynucleotide Phosphorylase Mutants of Escherichia coli
J. Bacteriol. **97**, 1431-1436
- Riva, S. & Silvestri, L. G. (1972)
Rifamycins: A General View
Ann. Rev. Microbiol. **26**, 199-224
- Rodriguez, R. L. & Tait, R. C. (1983)
Protocols for Minicell Purification and Labeling of Proteins in "Recombinant DNA Techniques" An Introduction, pp. 194-196
Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts
- Roozen, K. J., Fenwick Jr., R. G. & Curtiss III, R. (1971)
Synthesis of Ribonucleic Acid and Protein in Plasmid-Containing Minicells of Escherichia coli K-12
J. Bacteriol. **107**, 21-33
- Rosner, J. L. (1972)
Formation, Induction and Curing of Bacteriophage P1 Lysogens
Virology **48**, 679-689
- Russell, R. R. B. (1973)
Close Linkage of prd and rel Genes in Escherichia coli K-12
Mol. Gen. Genet. **124**, 369-370
- Sammons, D. W., Adams, L. D. & Nishizawa, E. E. (1981)
Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels
Electrophoresis **2**, 135-141
- Schnaitman, C. A. (1970 a)
Examination of the Protein Composition of the Cell Envelope of Escherichia coli by Polyacrylamide Gel Electrophoresis
J. Bacteriol. **104**, 882-889

Schnaitman, C. A. (1970 b)

Protein Composition of the Cell Wall and Cytoplasmic Membrane of Escherichia coli

J. Bacteriol. **104**, 890-901

Scudamore, R. A., Beveridge, T. J. & Goldner, M. (1979)

Outer Membrane Penetration Barriers as Components of Intrinsic Resistance to Beta-Lactam and other Antibiotics in Escherichia coli K-12

Antimicrob. Agents Chemother. **15**, 182-189

Seydel, F. (1978)

Isolierung und Charakterisierung eines Rifampicin-bindenden Proteins aus dem Periplasma von Escherichia coli

Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München

Sonntag, I. Schwarz, H. Hiroto, Y. & Henning, U. (1978)

Cell Envelope and Shape of Escherichia coli: Multiple Mutants Missing the Outer Membrane Lipoprotein and Other Major Outer Membrane Proteins

J. Bacteriol. **136**, 280-285

Spencer, M. E. & Guest, J. R. (1974)

Proteins of the Inner Membrane of Escherichia coli: Identification of Succinate Dehydrogenase by Polyacrylamide Gel Electrophoresis with sdh Amber Mutants

J. Bacteriol. **117**, 947-953

Steele, B. F., Saubereich, H. E., Reynolds, M. S. & Baumann, C. A. (1949)

Media for Leuconostoc Mesenteroides P-60 and Leuconostoc Citrovorum 8081

J. Biol. Chem. **177**, 533-544

Stent, G. S. & Calendar, R. (1978)

Molecular Genetics - An Introductory Narrative, pp. 413-463
Freeman and Company, San Francisco

Sutcliffe, J. G. (1979)

Complete Nucleotide Sequence of the Escherichia coli Plasmid pBR 322

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **43**, 77-90

- Suzuki, H., Nishimura, Y., Yasuda, S., Nishimura, A., Yamada, M. & Hiroto, Y. (1978)
Murein-Lipoprotein of Escherichia coli: A Protein Involved in the Stabilization of Bacterial Cell Envelope
Mol. Gen. Genet. **167**, 1-9
- Taylor, A. L. (1963)
Bacteriophage-Induced Mutations in Escherichia coli
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **50**, 1043-1051
- Tocchini-Valentini, G. P. Marino, P. & Colvill, A. J. (1968)
Mutant of E. coli containing an Altered DNA-dependent RNA Polymerase
Nature **220**, 275-276
- Tropschug, M. & Hartmann, G. R. (1980)
Isolation and Characterization of Rifampicin Uptake Mutants of Escherichia coli
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. **361**, 1351-1352
- Tropschug, M. (1981)
Untersuchungen zur Aufnahme von Rifamycinen in Escherichia coli K-12
Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München
- van Doorn, J., Oudega, B., Mooi, F. R. & de Graaf, F. K. (1982)
Subcellular localization of polypeptides involved in the biosynthesis of K88ab fimbriae
FEMS Microbiol. Lett. **13**, 99-104
- van Heerikhuizen, H., Kwak, E., van Bruggen, E. F. J. & Witholt, B. (1975)
Characterization of a Low Density Cytoplasmic Membrane Subfraction isolated from E. coli
Biochim. Biophys. Acta **413**, 177-191
- Vieira, J. & Messing, J. (1982)
The pUC Plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers
Gene **19**, 259-268
- Wade, H. E. & Robinson, H. K. (1966)
Magnesium Ion-Independent Ribonucleic Acid Depolymerases in Bacteria
Biochem. J. **101**, 467-479

- Wagegg, W. & Braun, V. (1981)
Ferric Citrate Transport in Escherichia coli Requires Outer
Membrane Receptor Protein FecA
J. Bacteriol. **145**, 156-163
- Walker, J. M. & Gaastra, W. (1983)
Techniques in Molecular Biology, pp. 241-255
Groom Helm, London & Canberra
- Wehrli, W. (1977)
Ansamycins - Chemistry, Biosynthesis and Biological Activity
Top. Curr. Chem. **72**, 21-49
- Wehrli, W., Knüsel, F., Schmid, K. & Staehelin, M. (1968)
Interaction of Rifamycin with Bacterial RNA Polymerase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **61**, 667-673
- Wehrli, W. & Staehelin, M. (1969)
The Rifamycins - Relation of Chemical Structure and Action
on RNA Polymerase
Biochim. Biophys. Acta **182**, 24-29
- White, R. J. & Lancini, G. (1971)
Uptake and Binding of [^3H] Rifampicin by Escherichia coli and
Staphylococcus Aureus
Biochim. Biophys. Acta **240**, 429-434
- Wijsman, H. J. W. (1972)
Mutants Affecting Plasmolysis in Escherichia coli
J. Bacteriol. **110**, 789-790
- Wijsman, H. J. W. & Pafort, H. C. (1974)
Pleiotropic Mutations in Escherichia coli Conferring Tolerance
to Glycine and Sensitivity to Penicillin
Mol. Gen. Genet. **128**, 349-357
- Witholt, B., Boekhout, M., Kingma, J., van Heerikhuizen, H. & Deleij, L.
(1976)
An Efficient and Reproducible Procedure for the Formation of
Spheroplasts from Various Grown Escherichia coli
Anal. Biochem. **74**, 160-170
- Wozny, M. E., Carnevale, H. N. & Jones, E. E. (1975)
Alteration of regulation of arginine biosynthesis in E. coli
by mutation to rifampicin resistance
Biochim. Biophys. Acta **383**, 106-116

- Wu, H. C. & Lin, J. J.-C. (1976)
Escherichia coli Mutants Altered in Murein Lipoprotein
J. Bacteriol. **126**, 147-156
- Yagil, E., Beacham, I. R., Nissim, A. & Price, G. (1978)
Crypticity of Periplasmic Enzymes - Involvement of protein b
in the permeability of the outer membrane of Escherichia coli
FEBS Lett. **85**, 133-136
- Yamamoto, M. & Nomura, M. (1979)
Organization of Genes for Transcription and Translation in the
rif Region of the Escherichia coli Chromosom
J. Bacteriol. **137**, 584-594
- Yanofsky, C., Carlton, B. C., Guest, J. R., Helinski, D. R. & Henning, U
(1964)
On the Colinearity of Gene Structure and Protein Structure
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **51**, 266-272
- Zähner, H. (1965)
Biologie der Antibiotika
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Zähner, H. (1977)
Einige Aspekte der Antibiotica-Forschung
Angew. Chem. **89**, 696-703
- Zubay, G. (1973)
In vitro Synthesis of Protein in Microbial Systems
Ann. Rev. Genet. **7**, 267-287

Abkürzungsverzeichnis

Ap	Ampicillin
bp	Basenpaar
cam, Cm	Chloramphenicol
EtBr	Ethidiumbromid
IpM	Impulse pro Minute
Kan	Kanamycin
kD	Kilodalton
M9	Minimalmedium
Mr	relative Molmasse
PAA	Polyacrylamid
pfp	p-Fluorphenylalanin
PFU	Plaque bildende Einheit
Rif	Rifampicin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm, str	Streptomycin
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
Tc	Tetracyclin
TE	Tris/EDTA
UpM	Umdrehungen pro Minute
YT	Vollmedium

Lebenslauf

Name	Margit Claudia Kollenda
Geburtsdatum	0.6.04.1956
Geburtsort	Kemnath/Stadt, Opf.
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Eltern	Hans-Günther Kollenda, Oberstudiendirektor Hildegard Kollenda, geb. Huber, 1966 verstorben
Schulausbildung	
1962-1964	Deutsche Schule, Addis Abeba, Äthiopien
1964-1968	Volksschule, Neumarkt, Opf.
1968-1972	Staatl. Realschule Haßfurt, Ufr. (sozialkundlich-musischer Zweig)
1972-1975	Städt. Sophie-Scholl-Gymnasium, München (sozialwissenschaftlicher Zweig)
21.6.1975	Abitur
Studium	
1975-1981	Studium der Diplomchemie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
9/80-7/81	Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität, München bei Prof. Dr. G. Hartmann
31.7.1981	Diplom
9/81-10/85	Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität, München bei Prof. Dr. G. Hartmann
seit 5/85	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

